Untersuchungen zur Toleranzentwicklung von organischen Nitraten und Sin - 1 an isolierten Rinderblutgefäßen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martin Heidrich

1985

UNIV.
LEIDEN
1932

Aus dem Institut für Pharmakologie der
Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. K. Greeff

Untersuchungen zur Toleranzentwicklung von organischen Nitraten und Sin-1 an isolierten Rinderblutgefäßen

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Martin Heidrich

1985

Als Inauguraldissertation
gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. med. A. Hopf

Referent

gez.:
Prof. Dr. med. Dr.
rer. nat. U. Borchard

Koreferent

gez.:
Prof. Dr. med.
B. Grabensee

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0083

Für wissenschaftliche Ratschläge und hilfreiche Anregungen richte ich meinen Dank besonders an den Leiter der elektrophysiologischen Abteilung des pharmakologischen Institutes der Universität Düsseldorf, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. U. Borchard. Gleichzeitig gilt mein Dank seinen Mitarbeitern, die mich bei der Durchführung des experimentellen Teils unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methodik	4
2.1	Präparation der Blutgefäße	4
2.2	Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	5
2.3	Bestimmung des Wirkungsverlustes von Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat	6
2.4	Bestimmung des Wirkungsverlustes von Sin-1	8
2.5	Bestimmung der Reversibilität der Toleranzentwicklung	10
2.6	Statistik	10
2.7	Substanzen	10
2.8	Abkürzungen	11
3.	Ergebnisse	12
3.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	12
3.1.1	Vasokonstriktorische Substanzen	12
3.1.2	Organische Nitrate und Sin-1	12
3.2	Konzentrationsabhängiger Wirkungsverlust von Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat	21
3.3	Unverminderte Wirksamkeit von Sin-1	29
3.4	Reversibilität der Nitrattoleranz	34
4.	Diskussion	36
5.	Zusammenfassung	46
6.	Literaturverzeichnis	49
7.	Lebenslauf	

1. Einleitung

Organische Nitrate und Molsidomin, ein Derivat der Sydnonimine, sind in der medikamentösen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen weit verbreitet. Häufige Indikationen sind die Angina pectoris, die akute und chronische Herzinsuffizienz sowie der akute Myokardinfarkt.

Ihre Wirkung beruht in erster Linie auf dem relaxierenden Effekt, der bevorzugt an der glatten Muskulatur postkapillärer Kapazitätsgefäße auftritt. Dadurch kommt es zum "venösen Pooling", das eine Senkung der Vorlast des Herzens und des enddiastolischen linksventrikulären Füllungsdruckes zur Folge hat und somit die Perfusion kritischer Myokardareale begünstigt (48).

Als Wirkungsmechanismus der organischen Nitrate auf zellulärer Ebene wird derzeitig die Interaktion mit sulfhydrylgruppenhaltigen Molekülstrukturen diskutiert (42-44), die letztlich zu einer Erhöhung des intrazellulären cGMP-Gehaltes führt (4, 5, 12-14a, 19, 21, 26, 27, 32-35, 46). Eine zusätzliche Beeinflussung des Prostaglandinstoffwechsels, des Thromboxan-A_2-Stoffwechsels und der Plättchenaggregation ließ sich mehrfach nachweisen (28, 29, 38, 39, 46, 48a, 54, 60). Die Vasodilatation durch organische Nitrate bzw. Molsidomin scheint jedoch nicht durch Prostaglandine vermittelt zu werden (6a).

Bei langfristiger Anwendung insbesondere hoher Dosierungen der sogenannten Langzeitnitrate wird seit längerer Zeit eine therapieinduzierte Toleranzentwicklung, d.h. eine Minderung der therapeutischen Wirksamkeit, diskutiert. Der Begriff "Toleranz" beinhaltet sowohl ein vermindertes Ansprechen des Zielorgans unter veränderten pharmakokinetischen Bedingungen

(pharmakokinetische Toleranz) als auch adaptive Veränderungen am Rezeptor (pharmakodynamische Toleranz) (55), wobei die Abschwächung der Wirkung jeweils langsam eintritt. Ein rasch einsetzender Wirkungsverlust wird demgegenüber als Tachyphylaxie bezeichnet.

Trotz zahlreicher kontrollierter Patientenstudien und tierexperimenteller Versuchsansätze mit organischen Nitraten sind die Meinungen über eine mögliche Toleranzentwicklung unter Langzeittherapie kontrovers (1, 2, 7-11, 18, 22-25, 36, 37, 45, 48, 50, 52, 53, 56, 57, 61-63, 65-69). Dies ist vor allem auf heterogene Patientenkollektive, mangelnde Patienten-Compliance und unterschiedliche Meßparameter sowie Studienprotokolle zurückzuführen (57). Auf der einen Seite wird in Therapiestudien häufig ein Wirkungsverlust von klinischer Relevanz angezweifelt (25, 50, 61), wobei zwar der Einfluß auf hämodynamische Parameter abgeschwächt ist, aber die antiischämische Wirksamkeit erhalten bleiben soll (partielle Toleranz), während andere Untersuchungen (8, 52, 53) zusätzlich auch einen Verlust der antianginösen Wirkungskomponente nachweisen (vollständige Toleranz). Einige Studien zeigen dagegen keinen Wirkungsverlust während der chronischen Therapie (7, 9, 11, 18, 24, 36, 62). Unterschiedliche Ergebnisse für arterielle und venöse Kreislaufregionen liegen ebenfalls vor (10, 37, 45).

Auch die vergleichsweise wenigen In-vitro-Untersuchungen an isolierten Blutgefäßen sind in ihren Aussagen nicht einheitlich (5, 27, 41-44, 48).

Neuere Nachforschungen ergaben verstärkt Hinweise auf eine relativ rasch einsetzende Nitrattoleranz (8, 10, 22, 23, 52, 53, 56, 63, 65-69), eine Dosisabhängigkeit dieses Vorgangs (23, 56, 66, 67) und eine Beeinflussung durch Variation der Medikationsintervalle (11, 52, 56, 63).

Molsidomin dagegen zeigt unter ähnlichen Versuchsbedingungen kein (9, 39a) oder nur ein angedeutetes Wirkungsdefizit (25, 50, 65, 67a).

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine mögliche Toleranzentwicklung gegenüber organischen Nitraten bzw. Molsidomin an isolierten Gefäßstreifen des Rindes zu untersuchen, um kreislaufregulatorische Einflüsse (Barorezeptorenreflexe, Katecholaminausschüttung (6), Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (6)) und pharmakokinetische Veränderungen (15) auszuschalten. Die angewendeten Konzentrationen wurden soweit wie möglich den therapeutischen Plasmaspiegeln angenähert (16, 20, 48, 49, 51, 64, 67).

Versuchsserien wurden zu folgenden Fragestellungen durchgeführt:

- Nitrattoleranz arterieller und venöser Gefäßstreifen bei Dauerexposition gegenüber Glyceroltrinitrat, Isosorbid-5-mononitrat (hepatischer Metabolit des Isosorbiddinitrat) oder Sin-1 (hepatischer Metabolit des Molsidomin).
- Zeitverlauf der Toleranzentwicklung.
- Einfluß des vasokonstriktorischen Stimulus auf das Auftreten der Nitrattoleranz.
- Einfluß der Konzentration auf das Ausmaß des Wirkungsverlustes.
- Reversibilität der induzierten Toleranz durch nitratfreie Intervalle.

UNIV. LEIDEN

2. Methodik

2.1 Präparation der Blutgefäße:

Die In-vitro-Untersuchungen wurden an Koronararterien (CA), Pulmonalarterien (PA) und Pulmonalvenen (PV) des Rindes durchgeführt.

Die Präparate aus den Organen frisch geschlachteter Rinder (Alter 1/2 - 1 Jahr) wurden proximalen Abschnitten des Ramus descendens der linken Koronararterie und Pulmonalvenen entlang des linken Stammbronchus entnommen, kurz perfundiert und in 4 °C kalter, mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begaster Krebs-Henseleit(KH)-Lösung transportiert. Die Entfernung des restlichen Adventitiagewebes erfolgte im Präparierbad unter weiterer Begasung. Anschließend wurden spiralförmige Streifen von ca. 20 - 25 mm Länge und ca. 4 mm Breite präpariert und zur Messung isometrischer Spannungsänderungen sofort oder nach ca. 24-stündiger Inkubation (begaste KH-Lösung, 4 °C) senkrecht in Organbädern eingespannt, die 25 ml einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung der folgenden Zusammensetzung (mmol/l) enthielten:

NaCl 118.5, KCl 4.7, $CaCl_2$ 1.9, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 24.9, NaH_2PO_4 1.2, Glukose 10.1, Na-Pyruvat 2.0.

Die Lösung wurde mit Carbogen begast. Der pH-Wert betrug 7.4; die Temperatur lag bei 31 °C. Die Spannung wurde mit isometrischen Kraftaufnehmern (Statham UC II, Gould Inc.) gemessen und nach Vorverstärkung (Verstärker DPA, i.f.d., Mescher) mit Mehrkanalschreibern (Recomed, Hellige) registriert. Die Vorspannung betrug 10 mN und wurde nach 1/2 - 1 Stunde nachjustiert; die Equilibrierungszeit betrug insgesamt mindestens eine Stunde.

2.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen:

Sowohl für die vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen Serotonin (Ser.), Histamin (His.), Phenylephrin (PE), Clonidin (CL) und Kaliumchlorid (K^+) als auch für die vasodilatatorisch wirkenden Pharmaka Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbid-5-mononitrat (IS-5-MN) und Sin-1 wurden kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven angelegt.

Die Vasokonstriktion erfolgte aus der Ruhelage unter stufenweiser Erhöhung der Badkonzentration. Bei den Versuchen mit Phenylephrin und Clonidin wurden die Untersuchungen in Gegenwart des Betarezeptorenblokkers Pindolol in einer Konzentration von 3×10^{-7} mol/l durchgeführt.

Zur Ermittlung der Vasodilatation wurden die Gefäßstreifen zunächst mit Serotonin, Phenylephrin oder Kaliumchlorid vorkontrahiert. Kalium-induzierte Kontraktionen erreichten ein steady state, so daß der Vasodilatator daraufhin in kumulativ ansteigenden Konzentrationen bis zum Maximaleffekt zugegeben und im Anschluß daran die maximale Relaxation mit 10^{-4} mol/l Papaverin bestimmt werden konnte. Da sich bei Anwendung von Serotonin und Phenylephrin kein Plateau einstellte, war der Vergleich mit einer vorangehenden Kontrollkontraktion in Abwesenheit des Vasodilatators erforderlich. Im Anschluß an eine zweite Kontraktion wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den Vasodilatator entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen ermittelt, wobei mit der Vasodilatation unmittelbar nach dem Kontraktionsmaximum begonnen wurde. Die Zeitverläufe der in An- und Abwesenheit des Vasodilatators ausgelösten Kontraktionen wurden auf ihr Maximum (= 100 %) normiert und die für jede Konzentration des Vasodilatators gemessenen %-Werte mit Hilfe des zeitlich entsprechenden %-Wertes der Kontrollkontrak-

tion korrigiert. Die so erhaltenen %-Werte für die Relaxation wurden auf die maximale Relaxation (= 100 %) normiert.

Die relaxierende Wirkung von Verapamil (Isoptin^{R}) in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l auf Serotonin-Kontraktionen (PA, PV), Phenylephrin-Kontraktionen (PA) und Kalium-Kontraktionen (CA, PV) wurde durch Zugabe im Kontraktionsmaximum ermittelt und in % des Kontraktionsmaximums ausgedrückt.

2.3 Bestimmung des Wirkungsverlustes von Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat:

Um zeitliche Veränderungen im Funktionszustand der Präparate berücksichtigen zu können, war stets der Vergleich zwischen einem Versuchs(E)- und einem benachbarten Kontrollgefäßstreifen (C) notwendig. Beide Gefäßstreifen wurden zunächst ca. 30 Minuten unter 120 mmol/l Kaliumchlorid depolarisiert und anschliessend in regelmäßigen zeitlichen Abständen mit Serotonin, Histamin, Phenylephrin oder Kaliumchlorid kontrahiert. Die Konzentrationen dieser Vasokonstriktoren waren dabei so bemessen, daß sie im steilen Abschnitt der Konzentrations-Wirkungs-Kurven lagen und daß eine ausreichende Relaxation der Gefäße noch möglich war (siehe 2.2). Die Versuche mit Phenylephrin erfolgten wiederum unter Betarezeptorenblockade mit Pindolol in einer Konzentration von 3×10^{-7} mol/l. Die Zeitabstände betrugen für Kalium-Kontraktionen eine Stunde (30 Minuten Kontraktion, 30 Minuten Waschvorgang), für Serotonin-, Histamin- und Phenylephrin-induzierte Kontraktionen 35 Minuten (15 Minuten Kontraktion, 20 Minuten Waschvorgang).

Nach mindestens drei Vorkontraktionen erfolgte eine Bezugskontraktion (= 100 %) und im Anschluß daran die

Zugabe des organischen Nitrates (Zeitpunkt t = - 5). Die folgenden Kontraktionen wurden bei den Versuchsgefäßen unter ständigem Nitrateinfluß durchgeführt, während die entsprechenden Kontrollgefäße nitratfrei blieben und nur bei Verwendung der Äthanol-haltigen Glyceroltrinitrat-Lösung die gleiche Konzentration Äthanol erhielten.

Die Konzentrationen für Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat wurden so gewählt, daß sich ein Wirkungsverlust in den steilen Abschnitt der Konzentrations-Wirkungs-Kurven projizierte (siehe 2.2).

Für die Bestimmung langfristiger Wirksamkeitsverluste wurden einige Präparate 3.0 bzw. 3.5 Stunden nach Nitratzugabe für 12 Stunden (über Nacht) in der Nitrat-haltigen Versuchslösung inkubiert und danach erneut in den oben aufgeführten Zeitabständen kontrahiert.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Toleranzentwicklung wurde an Hand von Versuchsserien unter Anwendung unterschiedlicher Nitratkonzentrationen beurteilt.

Auswertung:

Für jeden Gefäßstreifen wurden die einzelnen Kontraktionsmaxima (Ser. und PE) bzw. die Kontraktionswerte 10 Minuten nach Kontraktionsbeginn (K^+) unter Nitrateinfluß bestimmt und in Relation zur Bezugskonzentration (= 100 %) gesetzt. Beim Vergleich dieser Werte (%) jeweils eines Versuchsstreifens mit denen des entsprechenden Kontrollstreifens ließ sich die initiale Relaxation (%) und der prozentuale Wirkungsverlust zum Zeitpunkt t folgendermaßen errechnen:

a) Initiale Relaxation in %:

$$100 - \frac{E_o}{C_o} \times 100$$

b) Wirkungsverlust zum Zeitpunkt t in %:

$$\frac{(C_o - E_o) - (C_t - E_t)}{C_o - E_o} \times 100$$

mit: $C_{o,t}$ Kontrollstreifen; Kontraktionskraft in % der Bezugskontraktion (= 100 %) zum Zeitpunkt t = 0 bzw. t.

$E_{o,t}$ Versuchsstreifen; Kontraktionskraft in % der Bezugskontraktion (= 100 %) zum Zeitpunkt t = 0 bzw. t.

C_o-E_o Nitratwirkung zum Zeitpunkt t = 0, Initialwirkung.

C_t-E_t Nitratwirkung zum Zeitpunkt t.

2.4 Bestimmung des Wirkungsverlustes von Sin-1:

Da Sin-1 nur im sauren Milieu ausreichend stabil ist und bei pH 7.4 über Sin-1A zu Sin-1C (N-Morpholino-iminoacetonitril) zerfällt, mußte das unter 2.3 beschriebene Verfahren wie folgt modifiziert werden. Drei benachbarte Gefäßstreifen einer Pulmonalvene wurden nach Depolarisation mit 120 mmol/l Kaliumchlorid in Intervallen von 35 Minuten für jeweils 10 Minuten unter 3×10^{-8} mol/l Serotonin fortlaufend kontrahiert. Nach der Bezugskontraktion (= 100 %) stand ein Gefäßstreifen (Versuchsstreifen E) unter ständigem Sin-1-Einfluß, die beiden anderen Präparate erhielten vor jeder Kontraktion entweder eine bei 31 °C über den gleichen Zeitraum begaste Sin-1-Stammlösung (Sin-1 gelöst in KH-Lösung, Kontrollstreifen C) oder eine mit HCl bei pH 6.0 stabilisierte Sin-1-Stammlö-

sung (Sin-1 gelöst in H_2O, pH = 6.0, 20 °C, unbegast). In allen drei Badgefäßen betrug die Sin-1-Konzentration zum Zeitpunkt t = -5 7 x 10^{-7} mol/l.

Quantitative Analysen tiefgefrorener, lichtgeschützter und bei pH 3.4 gepufferter Proben der Badlösungen und Sin-1-Stammlösungen, die freundlicherweise von der Firma Cassella-Riedel (Frankfurt/M.) durchgeführt wurden, lieferten Daten über zeitliche Konzentrationsänderungen. Die Probenentnahme erfolgte 15 Minuten nach Sin-1 Zugabe.

Auswertung:

Um eine ausreichende Einwirkungszeit von 15 Minuten zu gewährleisten, wurde Sin-1 5 Minuten vor dem Vasokonstriktor zugegeben und die Vasodilatation jeweils 10 Minuten nach Kontraktionsbeginn bestimmt. Unter Berücksichtigung des Zerfalls von Sin-1 wurde der Wirkungsverlust, der einer möglichen Toleranzentwicklung zuzuschreiben war, zu verschiedenen Zeitpunkten t folgendermaßen bestimmt:

a) Wirkungsverlust zum Zeitpunkt t (verursacht durch Substanzzerfall und eine mögliche gleichzeitige Toleranzentwicklung) für die Versuchsstreifen (E) in %:

$$Q_E = \frac{(100 - E_o) - (100 - E_t)}{100 - E_o} \times 100$$

b) Wirkungsverlust zum Zeitpunkt t (verursacht nur durch Substanzzerfall) für die Kontrollstreifen (C) in %:

$$Q_C = \frac{(100 - C_o) - (100 - C_t)}{100 - C_o} \times 100$$

c) Toleranzentwicklung zum Zeitpunkt t in % unter Ausschluß des Substanzzerfalls:

$$Q_E - Q_C$$

2.5 Bestimmung der Reversibilität der Toleranzentwicklung:

Die Erzeugung der Nitrattoleranz gegenüber Glyceroltrinitrat (10^{-7} mol/l) und Isosorbid-5-mononitrat (10^{-4} mol/l) entsprach dem unter 2.3 beschriebenen Vorgehen (Pulmonalvenen, kontrahiert mit Serotonin 10^{-7} mol/l). Das Ausmaß der Reversibilität wurde an Hand der Relaxation nach nitratfreien Intervallen unterschiedlicher Dauer ermittelt.

2.6 Statistik:

Sämtliche Meßwerte sind als Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) angegeben. Den statistischen Berechnungen lag der t-Test für gepaarte Stichproben zugrunde. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0.05 angenommen.

2.7 Substanzen:

Glyceroltrinitratlösung, 1 %ig (in Äthanol), Merck
Isosorbid-5-mononitrat, Sanol-Schwarz
Sin-1, Cassela-Riedel
Papaverin-HCl, La Roche
Isoptin, Knoll

Pindolol, Boehringer-Ingelheim

Serotonin-Kreatininsulfat, Merck
Histamin-HCl, Merck
L-Phenylephrin, Boehringer-Ingelheim
Clonidin, Sandoz
Kaliumchlorid, Merck

2.8 Abkürzungen:

CA	Koronararterie
PA	Pulmonalarterie
PV	Pulmonalvene
Ser.	Serotonin
His.	Histamin
PE	Phenylephrin
CL	Clonidin
K^+	Kaliumchlorid
GTN	Glyceroltrinitrat
IS-5-MN	Isosorbid-5-mononitrat

3. Ergebnisse

3.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

3.1.1 Vasokonstriktorische Substanzen:

Die halblogarithmischen Konzentrations-Wirkungs-Kurven der untersuchten Vasokonstriktoren sind in Abb. 1 für die arteriellen Gefäßstreifen bzw. in Abb. 2 für die Pulmonalvenen dargestellt; die entsprechenden Kontraktionsmaxima (mN) sowie die EC_{50}-Werte (mol/l) zeigt Tab. 1.

Serotonin induzierte an allen Gefäßstreifen (CA, PA, PV) eine ausgeprägte Vasokonstriktion (Maximaleffekt: CA 30 $\pm$ 4, PA 92 $\pm$ 8, PV 119 $\pm$ 16 mN, n = 6 - 12). Die Serotoninkontraktionen an den Koronararterien erwiesen sich jedoch infolge der Überlagerung durch rhythmische Eigenkontraktionen für die Toleranzuntersuchungen als ungeeignet. Eine ausreichende Vasokonstriktion durch eine selektive Stimulation der Alpha-1-Rezeptoren mit Phenylephrin war nur bei Pulmonalarterien möglich. Die Kontraktionsamplituden der Koronararterien und Pulmonalvenen, ausgelöst durch 10^{-4} mol/l Phenylephrin, waren sehr gering (<3 mN). Clonidin, ein relativ spezifischer Alpha-2-Rezeptorenagonist, hatte in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l weder an den arteriellen Gefäßstreifen noch an den Pulmunalvenen einen nennenswerten vasokonstriktorischen Effekt.

3.1.2 Organische Nitrate und Sin-1:

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Vasodilatatoren sind in Abb. 3 (arterielle Gefäße) und in Abb. 4 (Pulmonalvenen) veranschaulicht, die entsprechenden Maximaleffekte, EC_{50}-Werte und die Wirkung

von Papaverin (10^{-4} mol/l) in Tab. 2 zusammengefaßt. Die Konzentrationen der vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen waren in der Regel so bemessen, daß eine ausreichende Relaxation unter maximaler Konzentration des Vasodilatators erfolgen konnte.

Glyceroltrinitrat erwies sich als stärkster Vasodilatator, gefolgt von Sin-1 und Isosorbid-5-mononitrat, dessen Konzentrations-Wirkungs-Kurve, verglichen mit der des Glyceroltrinitrates, um ca. 2 - 3 log-Einheiten zu höheren Konzentrationen verschoben war. Ein steady state war bei der Relaxation der Pulmonalvenen (kontrahiert mit Serotonin) mit Glyceroltrinitrat oder Isosorbid-5-mononitrat bereits nach ca. 5 Minuten, mit Sin-1 erst nach ca. 15 Minuten erreicht. Die zusätzliche Relaxation mit Papaverin (10^{-4} mol/l) hob die Vasokonstriktion nahezu vollständig auf.

Verapamil in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l führte im Anschluß an das Kontraktionsmaximum der Serotoninkontraktionen (PA, PV), Phenylephrin-Kontraktionen (PA) und Kalium-Kontraktionen (CA, PV) zu einer langsamen Vasodilatation. Wie aus Tab. 3 zu entnehmen ist, war diese jeweils nahezu vollständig.

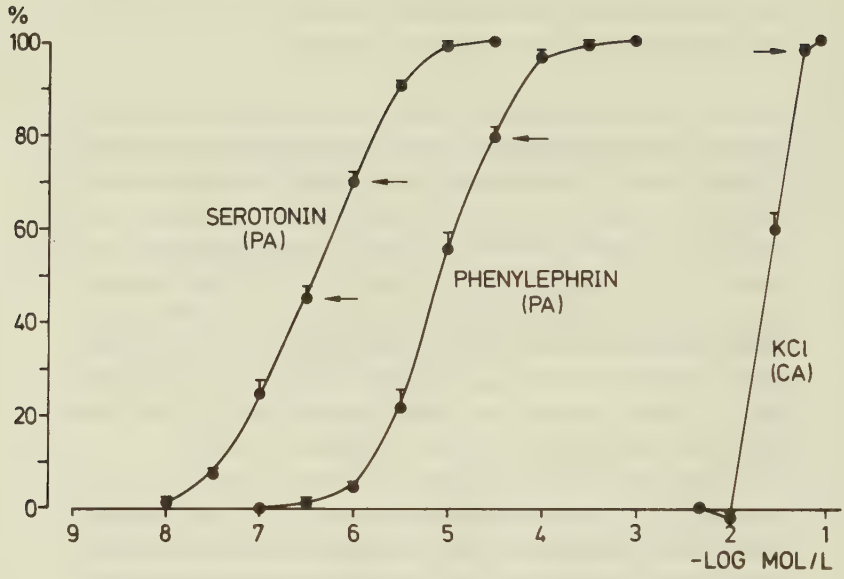

Abb. 1: Konzentrationsabhängigkeit der vasokonstriktorischen Wirkung (%) von Serotonin und Phenylephrin an der Pulmonalarterie (PA) und von Kaliumchlorid an der Koronararterie (CA) des Rindes. Es wurde die isometrische Kontraktionskraft isolierter, spiralförmiger Gefäßstreifen gemessen (n = 6 - 12). Die Einzelwerte wurden auf den jeweiligen Maximaleffekt (= 100 %) bezogen. Phenylephrin wurde unter Betarezeptorenblockade (3×10^{-7} mol/l Pindolol) untersucht. Die Pfeile markieren die für die Toleranzuntersuchungen verwendeten Konzentrationen. Die Konzentrationsmaxima und EC_{50}-Werte sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

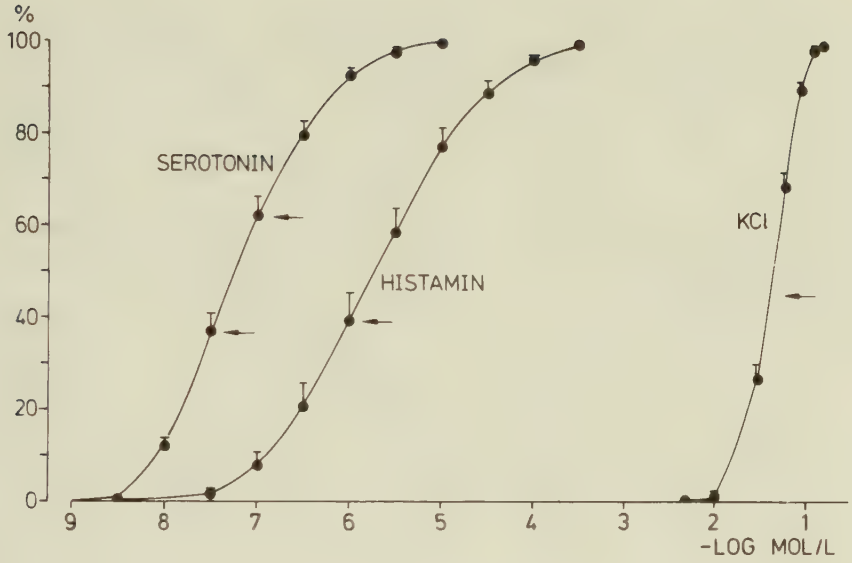

Abb. 2: Konzentrationsabhängigkeit der vasokonstriktorischen Wirkung (%) von Serotonin, Histamin und Kaliumchlorid an der Pulmonalvene des Rindes, ermittelt durch Messung der isometrischen Kontraktionskraft isolierter, spiralförmiger Gefäßstreifen (n = 6 - 12). Die Einzelwerte wurden auf den jeweiligen Maximaleffekt (= 100 %) bezogen. Die Pfeile markieren die für die Toleranzuntersuchungen verwendeten Konzentrationen. Die Maximalwerte und die EC_{50}-Werte sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Gefäß	Vasokonstriktor	(mol/l)	Kontraktionsmaximum (mN/100 %)	EC_{50} (mol/l)	n
PA	Ser.	3×10^{-5}	92 ± 8	2.60×10^{-7}	6
PA	PE	10^{-3}	44 ± 8	8.92×10^{-6}	7
PA	CL	10^{-4}	0 ± 0	-	10
CA	Ser.	3×10^{-5}	30 ± 4	5.61×10^{-7}	9
CA	PE	10^{-4}	0 ± 0	-	12
CA	CL	10^{-4}	0 ± 0	-	6
CA	K^+	9×10^{-2}	42 ± 4	-	6
PV	Ser.	10^{-5}	119 ± 16	6.35×10^{-8}	12
PV	His.	3×10^{-4}	84 ± 14	1.91×10^{-6}	6
PV	PE	10^{-4}	3 ± 1	-	14
PV	CL	10^{-4}	0 ± 0	-	14
PV	K^+	1.5×10^{-1}	59 ± 9	4.33×10^{-2}	6

Tab. 1: Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) der Kontraktionsmaxima (mN) für die aufgelisteten Vasokonstriktoren, ermittelt aus kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven (vgl. Abb. 1 und Abb. 2) der Gefäßstreifen CA, PA und PV. Bei den angegebenen Konzentrationen wurden die Maximaleffekte erzielt. Abkürzungen siehe Methodik, Abschnitt 2.8.

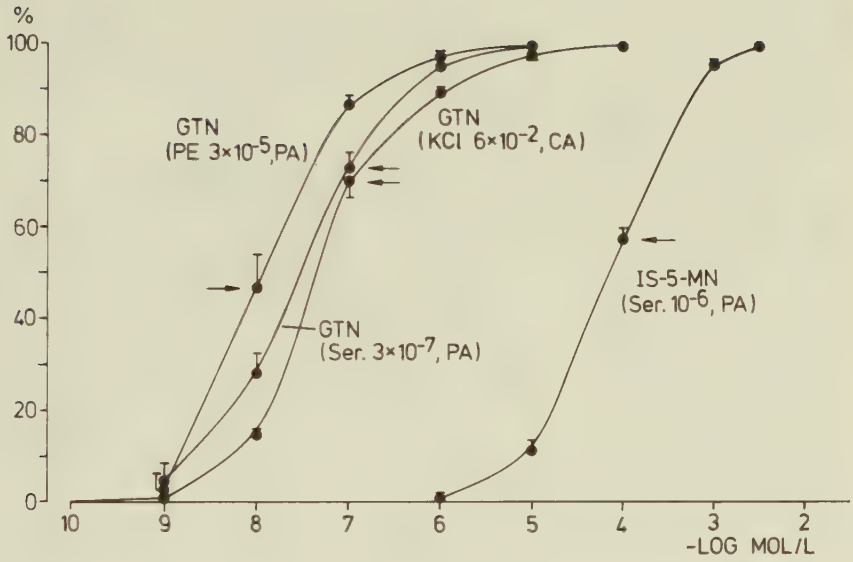

Abb. 3: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Vasodilatation von Glyceroltrinitrat (GTN) und Isosorbid-5-mononitrat (IS-5-MN) an isolierten Gefäßstreifen der Koronararterie (CA) bzw. Pulmonalarterie (PA) des Rindes, angegeben in % des jeweiligen Maximaleffektes (= 100 %), (n = 3 - 6). Die Gefäßstreifen wurden zunächst mit den in Klammern angegebenen Vasokonstriktoren in angegebener Konzentration (mol/l) vorkontrahiert. Die Pfeile markieren die für die Toleranzuntersuchungen verwendeten Nitratkonzentrationen. Die Maximalwerte und EC_{50}-Werte sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

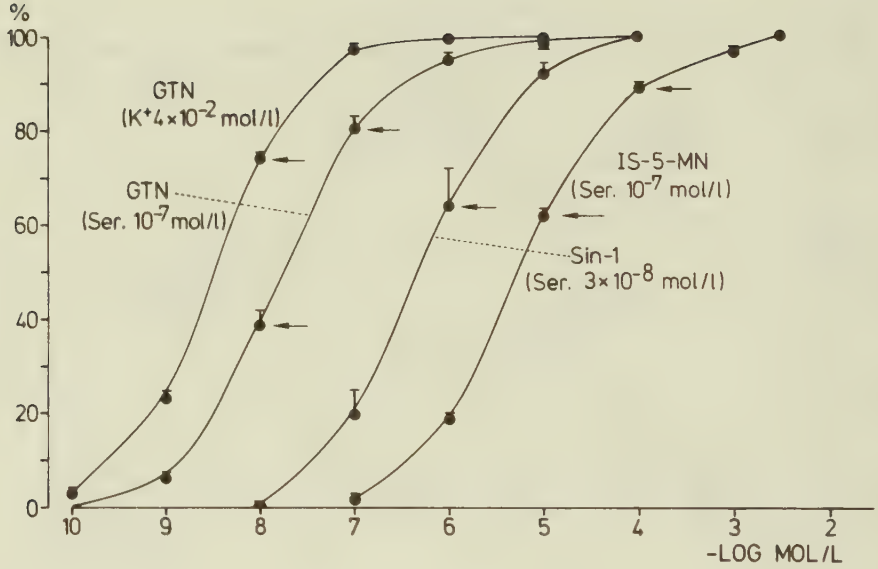

Abb. 4: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Vasodilatatoren Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbid-5-mononitrat (IS-5-MN) und Sin-1 an isolierten Gefäßstreifen der Pulmonalvene des Rindes, angegeben in % des jeweiligen Maximaleffektes (= 100 %), (n = 6 - 12). Die Gefäßstreifen wurden zunächst mit den in Klammern angegebenen Vasokonstriktoren vorkontrahiert. Die Pfeile markieren die für die Toleranzuntersuchungen verwendeten Konzentrationen. Die Maximalwerte und EC_{50}-Werte sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Gefäß	Vasokonstriktor (mol/l)		Kontraktionskraft der Kontrollkontraktion (mN)	Kontraktionskraft vor Relaxation (mN)	Vasodilatator (mol/l)		Maximalrelaxation (%)	EC_{50} (mol/l)	Relaxation unter Papaverin 10^{-4} mol/l, (%)	n
PA	Ser.	3×10^{-7}	9 ± 2	10 ± 2	GTN	10^{-5}	84.0 ± 2.0	3.09×10^{-8}	100.4 ± 2.6	6
PA	Ser.	10^{-6}	21 ± 3	22 ± 2	IS-5-MN	3×10^{-3}	58.0 ± 2.5	7.04×10^{-5}	100.0 ± 0.1	6
PA	PE	3×10^{-5}	31 ± 4	30 ± 4	GTN	10^{-5}	98.3 ± 0.8	1.37×10^{-8}	100.0 ± 0.3	6
CA	K^+	6×10^{-2}	-	40 ± 10	GTN	10^{-4}	92.6 ± 1.8	5.90×10^{-8}	-	3
PV	Ser.	10^{-7}	67 ± 11	68 ± 10	GTN	10^{-4}	81.1 ± 2.7	2.03×10^{-8}	100.0 ± 0.6	12
PV	Ser.	10^{-7}	51 ± 7	54 ± 7	IS-5-MN	3×10^{-3}	87.6 ± 1.1	6.52×10^{-6}	98.8 ± 0.6	11
PV	Ser.	3×10^{-8}	26 ± 7	29 ± 8	Sin-1	7×10^{-5}	91.2 ± 1.7	5.30×10^{-7}	99.1 ± 1.1	6
PV	K^+	4×10^{2}	-	27 ± 8	GTN	10^{-5}	78.1 ± 2.1	3.44×10^{-9}	101.4 ± 1.2	6

Tab. 2: Maximale erzielbare Relaxation der Gefäßstreifen (CA, PA, PV) unter Anwendung von Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbid-5-mononitrat (IS-5-MN) bzw. Sin-1, ermittelt aus kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven (vgl. Abb. 3 und Abb. 4). Unter Relaxation ist die Minderung der Ausgangskraft (%) der Versuchsgefäße zu verstehen. Die Konzentrationsangaben für die Vasodilatatoren beziehen sich auf den erreichten Maximaleffekt. Vor jeder Relaxation der Versuchsgefäße wurden mit den angegebenen Vasokonstriktoren (mol/l) Kontraktionen (mN) ausgelöst. Die Relaxation wurde entsprechend der zeitlichen Änderung der Kontrollkontraktionen korrigiert. Außerdem ist die maximale, mit 10^{-4} mol/l Papaverin auslösbare Relaxation angegeben.

Gefäß	Vasokonstriktor	(mol/l)	Kontraktionskraft (mN)	Kontraktionskraft nach 10^{-5} mol/l Verapamil (%)	n
PA	Ser.	3×10^{-7}	32 ± 6	1.8 ± 1.0	3
PA	PE	3×10^{-5}	24 ± 6	3.7 ± 1.4	6
CA	K^+	6×10^{-2}	74 ± 7	-1.7 ± 2.2	3
PV	Ser.	10^{-7}	76 ± 10	0.3 ± 0.6	9
PV	K^+	6×10^{-2}	68 ± 8	3.6 ± 1.9	4

Tab. 3: Relaxation der Gefäßstreifen (CA, PA, PV) durch 10^{-5} mol/l Verapamil, ausgedrückt in % der Kontraktionskraft vor Verapamil-Zugabe.

3.2 Konzentrationsabhängiger Wirkungsverlust von Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat:

Aus den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen (siehe 3.1) ergaben sich geeignete Konzentrationen zur Durchführung der Toleranzuntersuchungen. Die einzelnen Kombinationen eines Vasokonstriktors mit einem Vasodilatator und die angewendeten Konzentrationen gehen aus Tab. 4 hervor. Da Kalium-Depolarisationen der Pulmonalvenen auch nach mehreren Vorkontraktionen keinen gleichförmigen Kontraktionsverlauf aufwiesen, wurden sie nicht zu Toleranzuntersuchungen herangezogen. Histamin-induzierte Kontraktionen waren auf Grund einer starken Abnahme ihrer Kontraktionsamplituden nach mehrfacher Applikation ebenfalls ungeeignet, um die Wirkdauer von organischen Nitraten bzw. Sin-1 zu untersuchen.

Durch Vorschaltung einer Kalium-Depolarisation und drei Kontraktionen mit Serotonin, Phenylephrin bzw. Kaliumchlorid vor Zusatz des Vasodilatators konnte eine weitgehende Übereinstimmung ($\Delta\% < 2$) der an Versuchs- und Kontrollgefäßen ausgelösten Kontraktionen erzielt werden (Abb. 6). Von grundlegender Bedeutung erwies sich die Konstanthaltung von Kontraktionsintervall und -dauer. Im Anschluß an die Bezugskontraktion (= 100 %) erfolgte bei den Versuchsgefäßstreifen eine konzentrationsabhängige Relaxation unterschiedlichen Ausmaßes (Tab. 4), die an der Amplitudenminderung der in Anwesenheit des Vasodilatators ausgelösten Kontraktionen erkennbar war. Abb. 5 zeigt dies exemplarisch an einer Originalregistrierung zu einem Versuchsgefäß für die Bestimmung der Toleranzentwicklung von Isosorbid-5-mononitrat gegenüber intermittierenden Serotoninkontraktionen an Pulmonalvenen. Nach der initialen Relaxation waren bei den Versuchsgefäßstreifen deutlich ansteigende Kon-

traktionsamplituden als Ausdruck eines nachlassenden vasodilatatorischen Effektes und somit einer Toleranzentwicklung zu verzeichnen.

Aus dem zeitlichen Verlauf der Kontraktionsamplituden der Versuchs- und Kontrollgefäßstreifen wurde der Wirkungsverlust in Prozent bestimmt (siehe 2.3). Das Ergebnis der Untersuchungen mit Glyceroltrinitrat ist in Abb. 6 graphisch dargestellt. Die Mittelwerte für den Zeitverlauf der Toleranzentwicklung sind in den Abb. 7 (arterielle Gefäße) und Abb. 8 (Pulmonalvenen) zusammengefaßt.

Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat zeigten an der Koronararterie, Pulmonalarterie und Pulmonalvene signifikante Wirkungsverluste (Abb. 7 und Abb. 8).

Diese lagen für die arteriellen Gefäßstreifen nach 3.0 bzw. 3.5 Stunden je nach Vasokonstriktor in einem Bereich zwischen 35 und 65 % der Initialwirkung:

CA	K^+	6×10^{-2} mol/l	GTN	10^{-7} mol/l	35.6 ± 4.9 %	3.0 h
PA	Ser.	3×10^{-7} mol/l	GTN	10^{-7} mol/l	44.4 ± 4.6 %	3.5 h
PA	PE	3×10^{-5} mol/l	GTN	10^{-8} mol/l	48.2 ± 4.3 %	3.5 h
PA	Ser.	10^{-6} mol/l	IS-5-MN	10^{-4} mol/l	63.5 ± 3.9 %	3.5 h

Isosorbid-5-mononitrat wies an den Pulmonalarterien (kontrahiert mit Serotonin 10^{-6} mol/l) nach 15.5 Stunden keinen vasodilatatorischen Effekt mehr auf. Das Auftreten eines Wirkungsverlustes gegenüber Glyceroltrinitrat war bei den arteriellen Gefäßstreifen weitgehend unabhängig vom vasokonstriktorischen Stimulus (Ser., PE, K^+). Da die Kontraktion und Dilatation nicht mit einheitlichen Konzentrationen vergleichbarer Substanzen vorgenommen wurden, war eine vergleichende quantitative Aussage über das Ausmaß der Toleranzentwicklung jedoch nicht möglich.

Die Untersuchungen an den Pulmonalvenen wurden ausschließlich mit Serotonin als Vasokonstriktor in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l durchgeführt. Daher war hier eine quantitative Beurteilung der induzierten Wirkungsverluste für unterschiedliche Konzentrationen des gleichen Vasodilatators möglich. Sowohl Glyceroltrinitrat als auch Isosorbid-5-mononitrat wiesen konzentrationsabhängige Wirkungsdefizite in einem Bereich zwischen 35 und 70 % auf. Diese beliefen sich nach 3.5 Stunden im einzelnen auf:

53.6 $\pm$ 3.3 %	GTN	10^{-7}	mol/l
35.1 $\pm$ 4.3 %	GTN	10^{-8}	mol/l
66.5 $\pm$ 4.5 %	IS-5-MN	10^{-4}	mol/l
49.4 $\pm$ 3.8 %	IS-5-MN	10^{-5}	mol/l

Nach 15.5 Stunden ließ sich keine Gefäßrelaxation mehr nachweisen.

Gefäß	Vasokonstriktor	(mol/l)	Kontraktionskraft (mN)	Vasodilatator	(mol/l)	Relaxation (%)	n
PA	Ser.	3×10^{-7}	24 ± 3	GTN	10^{-7}	60.9 ± 2.6	11
PA	PE	3×10^{-5}	33 ± 4	GTN	10^{-8}	59.7 ± 6.4	10
PA	Ser.	10^{-6}	96 ± 14	IS-5-MN	10^{-4}	36.2 ± 4.4	6
CA	K^+	6×10^{-2}	53 ± 6	GTN	10^{-7}	52.4 ± 3.8	9
PV	Ser.	10^{-7}	91 ± 11	GTN	10^{-7}	62.0 ± 4.0	12
PV	Ser.	10^{-7}	81 ± 10	GTN	10^{-8}	25.9 ± 3.9	8
PV	Ser.	10^{-7}	62 ± 9	IS-5-MN	10^{-4}	59.8 ± 3.3	9
PV	Ser.	10^{-7}	69 ± 7	IS-5-MN	10^{-5}	36.0 ± 4.9	9
PV	Ser.	3×10^{-8}	54 ± 7	Sin-1	7×10^{-7}	68.0 ± 3.8	6
PV	K^+	4×10^{-2}	39 ± 3	GTN	10^{-8}	53.7 ± 2.4	11

Tab. 4: Relaxation in % der Bezugskontraktion (= 100 %) der Gefäßstreifen (CA, PA, PV) zum Zeitpunkt t = 0 für unterschiedliche Kombinationen eines Vasokonstriktors mit einem Vasodilatator unter Berücksichtigung des Zeitverlaufs der entsprechenden Kontrollkontraktionen. Versuchsdaten zu Abb. 5 und Abb. 6.

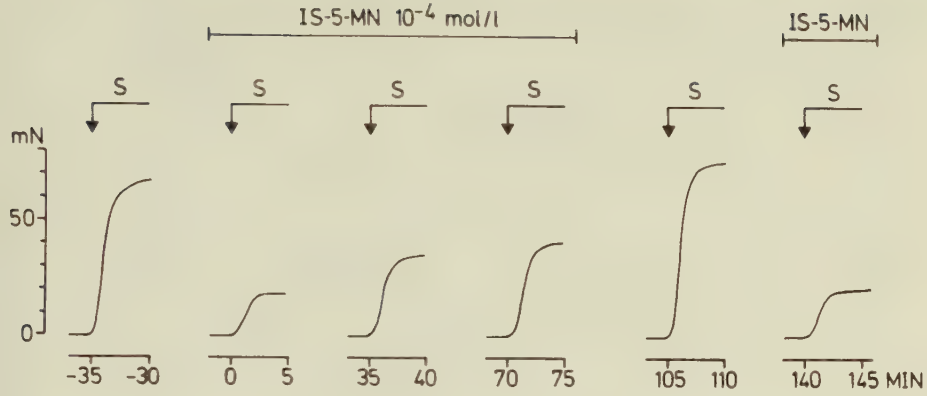

Abb. 5: Originalregistrierung der Kontraktionskraft eines Versuchsgefäßstreifens zur Ermittlung der Toleranzentwicklung gegenüber 10^{-4} mol/l Isosorbid-5-mononitrat (IS-5-MN) und deren Reversibilität an einem intermittierend mit 10^{-7} mol/l Serotonin (S) kontrahierten Spiralstreifen einer Rinderpulmonalvene. Die Kontrollkontraktion (t = - 35) wurde 30 Minuten vor Zugabe des Vasodilatators (t = - 5) ausgelöst. Die nach 5-minütiger Nitrateinwirkung (t = 0) registrierte Serotoninkontraktion zeigt die relaxierende Wirkung des Nitrates an. Der bei den nachfolgenden Kontraktionen (t = 35, 70) zu beobachtende Kontraktionskraftzuwachs war Ausdruck des toleranzbedingten Wirkungsverlustes unter dem ständigen Einfluß des Mononitrates. Ein eingeschobener Waschvorgang (ab t = 75) führte zur vollständigen Wiederherstellung des Serotonin-Effektes (t = 105). Eine erneute Vasodilatation (t = 140) zeigte eine weitgehende Reversibilität des Wirkungsverlustes von IS-5-MN. Die Ausgangswerte sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

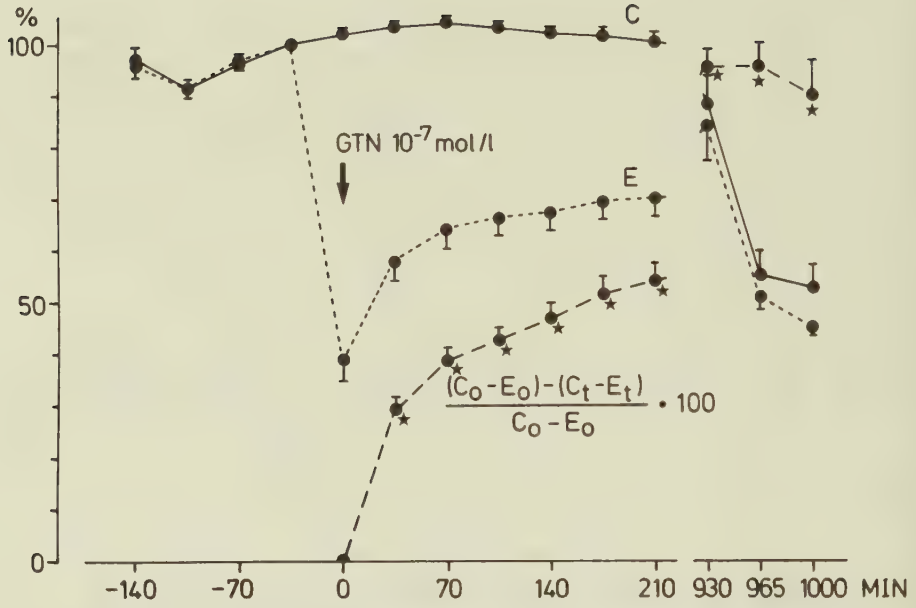

Abb. 6: Jeweils zwei benachbarte Gefäßstreifen einer Pulmonalvene wurden präpariert, von denen der eine als Kontrollstreifen (C), der andere als Versuchsstreifen (E) verwendet wurde. Beide Gefäßstreifen wurden in 35-minütigen Abständen mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l kontrahiert. Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) der Kontraktionsmaxima von Versuchs(E)- und Kontrollgefäßstreifen (C) in % der jeweiligen Bezugskontraktion (= 100 %) bei t = - 35. Bei t = - 5 erfolgte die Zugabe von 10^{-7} mol/l Glyceroltrinitrat (GTN) zum Versuchspräparat. Die relaxierende Wirkung ist an der 5 Minuten später (t = 0) ausgelösten Serotonin-Kontraktion zu erkennen. Aus der Zunahme der Kontraktionsamplituden der Versuchsgefäßstreifen in Gegenwart des Nitrates konnte unter Berücksichtigung der Kontraktionsmaxima der entsprechenden Kontrollgefäßstreifen der Wirkungsverlust nach der in der Abbildung angegebenen Formel errechnet (siehe Methodik, Abschnitt 2.3) und graphisch dargestellt werden. In der Zeit von der 210. bis zur 930. Minute (über Nacht) entfielen die Serotonin-Kontraktionen. Eine 16-stündige Inkubation erzeugte einen vollständigen Wirkungsverlust. Die Ausgangswerte sind in Tab. 4 zusammengefaßt. $\star p < 0.05$, Vergleich mit dem Kontrollwert bei t = 0, n = 6-12.

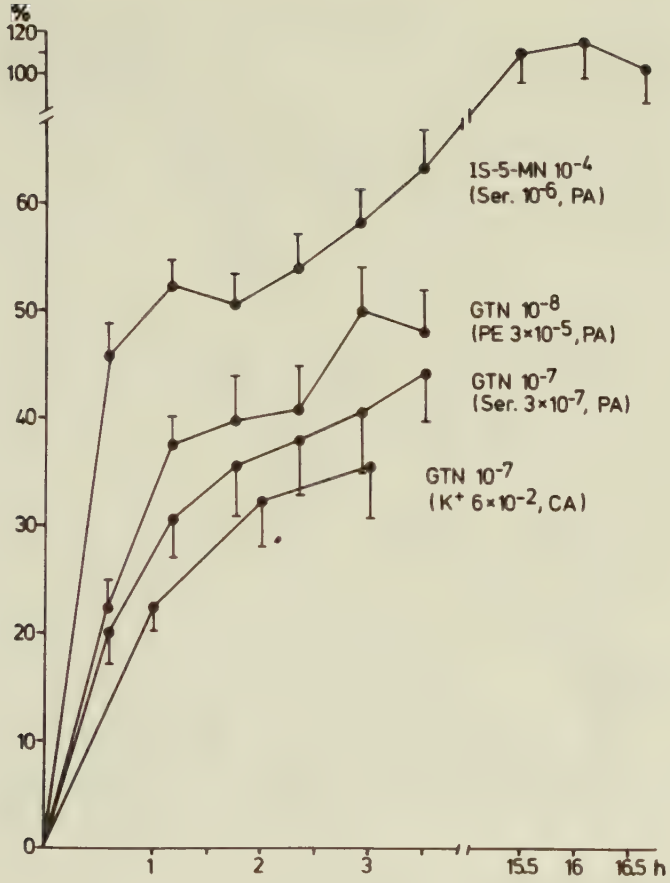

Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Toleranzentwicklung (%) an der Koronararterie (CA) und Pulmonalarterie (PA) des Rindes für verschiedene Kombinationen eines Vasokonstriktors mit einem Vasodilatator in angegebener Konzentration (mol/l), (n = 6 - 12). Die Auswertung erfolgte entsprechend der Beschreibung im Text zu Abb. 6 und den Angaben zur Methodik, Abschnitt 2.3. Für sämtliche Meßwerte gilt $p < 0.05$, Vergleich mit dem Kontrollwert bei $t = 0$.

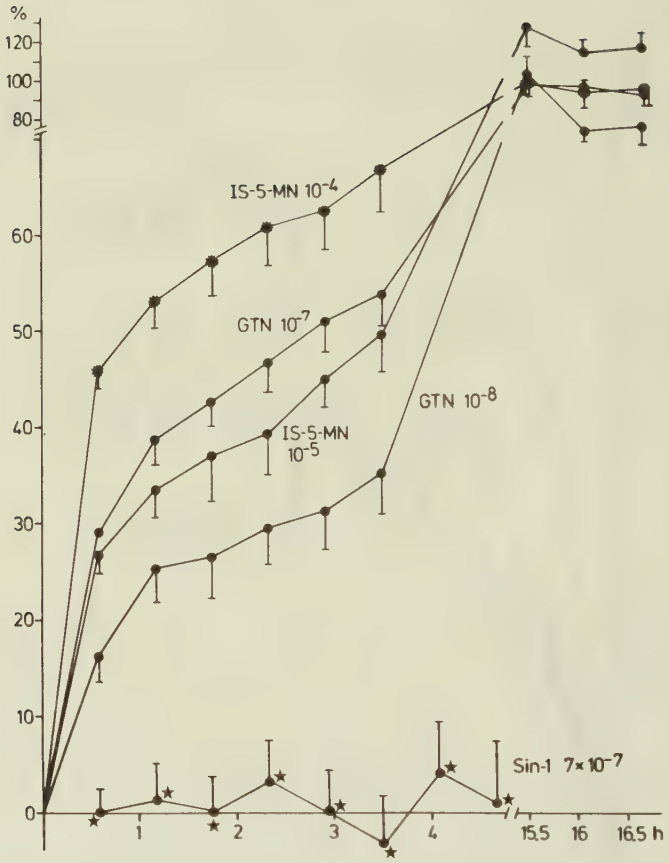

Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Toleranzentwicklung (%) an der Pulmonalvene des Rindes für Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbid-5-mononitrat (IS-5-MN) und Sin-1 (n = 6 - 12). Die Zahlenwerte neben den Kurven geben die Konzentrationen in mol/l an. Die Vasokonstriktion wurde durch Serotonin in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l bzw. 3×10^{-8} mol/l ausgelöst. Die Toleranzentwicklung gegenüber der vasorelaxierenden Wirkung von Sin-1 ließ sich nicht nachweisen (zur Methodik siehe Abschnitt 2.3 bzw. 2.4). Sämtliche Meßwerte mit Ausnahme der Meßwerte für Sin-1 unterschieden sich signifikant vom Kontrollwert bei t = 0 ★($p \geq 0.05$).

3.3 Unverminderte Wirksamkeit von Sin-1:

Die durch Serotonin auslösbaren Kontraktionen in % der jeweiligen Bezugskontraktion vor und während der Applikation von Sin-1 sind in Abb. 9 dargestellt. Infolge der Instabilität von Sin-1 wurde für jeweils drei von der gleichen Pulmonalvene des Rindes stammende Präparate unterschiedliche Versuchsbedingungen gewählt (siehe Methodik, Abschnitt 2.4).

Der Wirkungsverlust infolge des Substanzzerfalls (Gefäßstreifen C) unterschied sich vom Wirkungsdefizit infolge des Substanzzerfalls und einer gleichzeitig auftretenden Toleranzentwicklung (Gefäßstreifen E) nur unwesentlich. Entsprechend nahm die Differenz $Q_E - Q_C$ Werte an, die gegen eine Toleranzentwicklung gegenüber der Relaxation durch Sin-1 sprechen. Besonders aussagekräftig waren dabei die ersten beiden Meßwerte nach der initialen Relaxation, die eine ausgeprägte Vasodilatation anzeigten (siehe Abb. 9). Da Sin-1 mit zunehmender Versuchsdauer zerfiel, nahm die Relaxation kontinuierlich ab. Wäre eine konzentrationsabhängige Toleranzentwicklung wie im Falle der organischen Nitrate zu beobachten gewesen, so hätte diese wegen des Sin-1-Zerfalls kontinuierlich abnehmen müssen.

Die mit HCl auf pH 6.0 eingestellte Sin-1-Stammlösung wies keinen nennenswerten Substanzzerfall und an den Pulmonalvenen eine konstante Vasodilatation von ca. 68 % auf (Abb. 9).

Das Ergebnis der quantitativen Analyse der Sin-1-Konzentrationen der Bad- und Stammlösungen zeigen Tab. 5 und Abb. 10. Sin-1 zerfiel in der Bad- und Stammlösung bei pH 7.4 mit nahezu gleicher Geschwindigkeit, während in der Stammlösung bei pH 6.0 kein Substanzzerfall erfolgte. Die Halbwertszeit lag für Sin-1 in

der Badlösung bei $t_{1/2}$ = 1.17 Stunden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Proben erst 15 Minuten nach Sin-1-Zugabe zur Badlösung, d.h. 10 Minuten nach Kontraktionsbeginn entnommen wurden und somit bereits ein gewisser Substanzverlust zum Zeitpunkt t = 10 zu verzeichnen war.

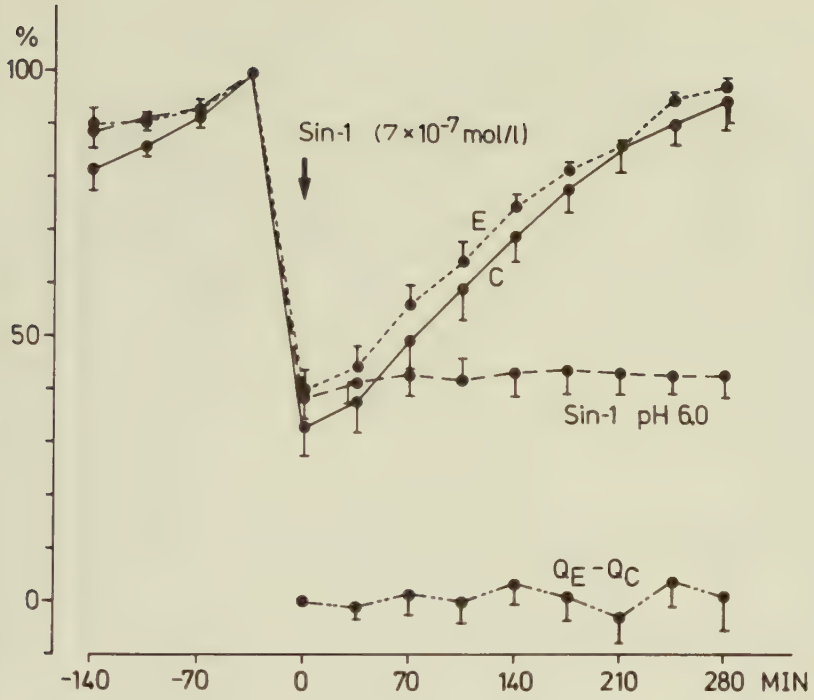

Abb. 9: Kontraktionsamplituden von drei Gefäßstreifen (jeweils n = 6) zur Untersuchung einer möglichen Toleranzentwicklung gegenüber Sin-1, umgerechnet auf die jeweilige Bezugskontraktion (= 100 %), (vgl. Abb. 6). Die Gefäßstreifen (E) standen unter ständiger Einwirkung von Sin-1, die anderen beiden Präparategruppen erhielten vor jeder Kontraktion die Sin-1-Stammlösungen mit pH 7.4 (C) bzw. pH 6.0. Aus der Differenz $Q_E - Q_C$ ergab sich kein Hinweis für einen Wirkungsverlust (zur Auswertung siehe Methodik, Abschnitt 2.4). Die Meßwerte für die Toleranz ($Q_E - Q_C$) unterschieden sich nicht signifikant vom Kontrollwert bei t = 0 ($p \geq 0.05$).

t Minuten	Sin-1-Konzentration der Badlösg. (mol/l)	Sin-1-Konzentration der Stammlösung bei pH = 7.4 (mol/l)	Sin-1-Konzentration der Stammlösung bei pH = 6.0 (mol/l)
10	6.1×10^{-7}	5.2×10^{-4}	5.8×10^{-4}
45	4.8×10^{-7}	3.8×10^{-4}	6.3×10^{-4}
80	3.2×10^{-7}	2.4×10^{-4}	6.9×10^{-4}
115	2.4×10^{-7}	1.7×10^{-4}	6.7×10^{-4}
150	1.7×10^{-7}	1.1×10^{-4}	7.6×10^{-4}
185	1.3×10^{-7}	0.8×10^{-4}	6.3×10^{-4}
220	0.8×10^{-7}	0.5×10^{-4}	5.9×10^{-4}
255	0.6×10^{-7}	0.2×10^{-4}	6.3×10^{-4}
290	0.4×10^{-7}	0.2×10^{-4}	6.3×10^{-4}
	$t_{1/2} = 1.17$ h	$t_{1/2} = 0.98$ h	$\bar{x} = 6.5 \times 10^{-4}$

Tab. 5: Sin-1-Konzentrationen der Badlösung und der Sin-1-Stammlösungen (Sin-1 gelöst in KH-Lösung, 31 °C und Sin-1 gelöst in H_2O, 20 °C, stabilisiert mit HCl) zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten t. Die Konzentrationen ergaben sich aus der quantitativen Analyse tiefgefrorener und lichtgeschützter Proben, die jeweils 15 Minuten nach Sin-1-Zugabe der Badlösung entnommen wurden (siehe Methodik, Abschnitt 2.4). Sin-1 zerfiel in der Badlösung und der Stammlösung bei pH = 7.4 nahezu gleich schnell; den exponentiellen Zerfall zeigt Abb. 10 in halblogarithmischer Darstellung für die Badlösung.

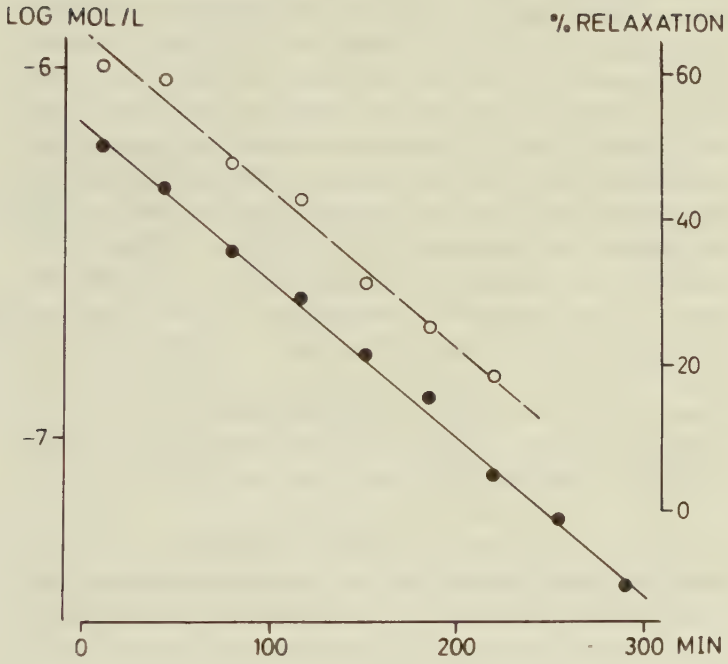

Abb. 10: Zeitabhängigkeit der Sin-1-Badkonzentration bei pH 7.4 und 31 °C (durchgezogene Linie) und der entsprechend verminderten vasodilatatorischen Wirkung von Sin-1 (gestrichelte Linie, r = 0.993) für die Kontrollgefäßstreifen (C) zur Toleranzuntersuchung (vgl. Abb. 9). Der Sin-1-Zerfall erfolgte exponentiell mit der Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 1.17 h. Die Konzentrationen ergaben sich aus der quantitativen Analyse von Proben, die der Badlösung jeweils 10 Minuten nach Kontraktionsbeginn (Ser. 3 x 10^{-8} mol/l) entnommen wurden (siehe Methodik, Abschnitt 2.4). Die Versuchsdaten sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

3.4 Reversibilität der Nitrattoleranz:

Abbildung 5 zeigt die Originalregistrierung von einem Versuchsgefäßstreifen dieser Versuchsreihe. Während einer 75-minütigen Einwirkzeit von 10^{-4} mol/l Isosorbid-5-mononitrat wurde zunächst die Toleranz induziert. In der anschließenden 65-minütigen nitratfreien Periode wurde die Wirkungsabschwächung weitgehend aufgehoben, so daß eine erneute Isosorbid-5-mononitrat-Applikation nahezu gleich stark wirksam war wie zu Beginn des Versuchs (t = 0). In gleicher Weise wurden Untersuchungen mit Glyceroltrinitrat durchgeführt. Die zunächst induzierten Wirkungsverluste (vgl. Abb. 11) betrugen für

Glyceroltrinitrat	10^{-7} mol/l	nach 105 Min.	36.0 ± 1.9 %
Glyceroltrinitrat	10^{-7} mol/l	nach 140 Min.	41.2 ± 2.5 %
Isosorbid-5-mononitrat	10^{-4} mol/l	nach 70 Min.	49.7 ± 6.4 % .

Eingeschobene Auswaschvorgänge führten zu einer partiellen Wiederherstellung der vasorelaxierenden Wirkung in Abhängigkeit von der Dauer der oben erwähnten nitratfreien Intervalle. Die Wirkungsverluste reduzierten sich für Glyceroltrinitrat (10^{-7} mol/l) nach einem 20-minütigen Waschvorgang von 41.2 ± 2.5 % auf 34.5 ± 3.5 %, nach einem 55-minütigen Waschvorgang von 36.0 ± 1.9 % auf 6.8 ± 3.1 % und für Isosorbid-5-mononitrat (10^{-4} mol/l) nach einem 135-minütigen Intervall von 49.7 ± 6.4 % auf 11.9 ± 4.9 %.

Die Serotoninkontraktionen, die auch in den nitratfreien Zeiträumen ausgelöst wurden, waren mit den entsprechenden Kontrollkontraktionen vergleichbar, wobei ihre Amplituden um ca. 5 - 12 % zunahmen.

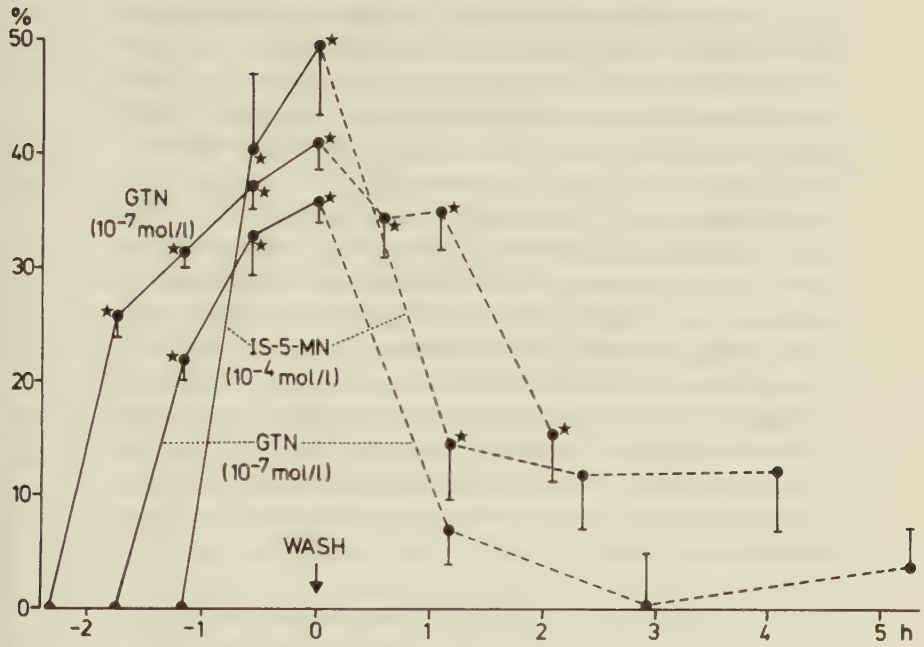

Abb. 11: Toleranzentwicklung (%) gegenüber Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat, induziert durch Vorinkubation für 1.2 bis 2.3 Stunden mit den organischen Nitraten in den angegebenen Konzentrationen (durchgezogene Linien, n = 8 - 12), und deren Reversibilität (gestrichelte Linie) nach Auswaschung der Nitrate bei t = 0. Die Kontraktionen wurden mit 10^{-7} mol/l Serotonin ausgelöst. $\star p < 0.05$, Vergleich zum Kontrollwert bei t = 0.

4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, daß die gefäßerweiternde Wirkung der organischen Nitrate Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat im Unterschied zu Sin-1 an isolierten Koronarterien, Pulmonalarterien und Pulmonalvenen des Rindes einer rasch einsetzenden Toleranzentwicklung unterliegen.

Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (5, 27, 41-44) ermöglichte der kontinuierliche Nitrateinfluß nach der initialen Relaxation eine exakte Quantifizierung und zeitliche Zuordnung des Wirkungsverlustes. Eingeschobene Waschvorgänge, wie sie zum Toleranznachweis an Hand der Verschiebung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven erforderlich sind, hätten zu einer partiellen Reversibilität im nitratfreien Intervall geführt. Die Toleranz, berechnet als prozentualer Wirkungsverlust, betrug nach 3.0 bis 3.5 Stunden 35 - 70 %.

Die untersuchten Gefäßstreifen repräsentieren Gefäßregionen, deren Dilatation in der Therapie mit organischen Nitratverbindungen eine wesentliche Wirkkomponente darstellt: Eine anhaltende Relaxation der proximalen Abschnitte der Koronararterien steigert die regionale Perfusion subendokardialer Myokardareale, deren Sauerstoff- und Substratversorgung besonders im Rahmen einer Ischämie gefährdet ist, und verbessert gleichzeitig die Versorgung über Kollateralkreisläufe (70). Das pulmonale Gefäßbett, das als Blutspeicher dem linken Herzen unmittelbar vorgeschaltet ist, hat mit ca. 25 % einen relativ hohen Anteil am Mechanismus des "venösen Pooling", der durch eine Senkung des Preload hauptverantwortlich für die mechanische Entlastung des linken aber auch des rechten Ventrikels ist (30).

Isosorbid-5-mononitrat bzw. Sin-1 stellen die hepatischen Metaboliten des Isosorbiddinitrat bzw. des Molsidomin dar (12, 14-16, 40, 48, 59). Die verwendeten Konzentrationen der organischen Nitrate konnten nur bedingt den therapeutischen Plasmaspiegeln (16, 20, 48, 49, 51, 64, 67) angeglichen werden, da relativ hohe Konzentrationen für eine ausreichende Relaxation zum Nachweis der Toleranz erforderlich waren. Das hydrophile Isosorbid-5-mononitrat mußte zur Erzielung des gleichen Effektes wie das lipophile Glyceroltrinitrat in 2 - 3 log-Einheiten höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Noak et al. (47) berichteten über den Zusammenhang zwischen der vasodilatatorischen Wirksamkeit der Toleranzinduktion und der Lipophilie organischer Nitrate. Ein quantitativer Vergleich der toleranzinduzierenden Eigenschaften von Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat ist nur bedingt möglich gewesen, da die verwendeten Konzentrationen nicht äquieffektiv waren. Für eine gleich starke toleranzerzeugende Wirkung beider Nitrate spricht die Beobachtung, daß das Ausmaß des während 3.5 Stunden gemessenen Wirkungsverlustes zu der vasodilatatorischen Wirkung der eingesetzten Konzentrationen korreliert (Abb. 12) und in der Reihenfolge abgestuft ist:

	Initialrelaxation	Wirkungsverlust
IS-5-MN 10^{-4} mol/l	59.8 ± 3.3 %	66.5 ± 4.5 %
GTN 10^{-7} mol/l	62.0 ± 4.0 %	53.6 ± 3.3 %
IS-5-MN 10^{-5} mol/l	36.0 ± 4.9 %	49.4 ± 3.8 %
GTN 10^{-8} mol/l	25.9 ± 3.9 %	35.1 ± 4.3 %

Die Toleranzentwicklung trat bei allen verwendeten Vasokonstriktoren auf und war nach 15.5 Stunden nahezu vollständig (ca. 100 %). Somit scheint die Toleranzentwicklung auf eigenständigen, von der Vasokonstriktion unabhängigen Mechanismen zu beruhen. Die Kontraktion der Gefäßstreifen läßt sich auf einen Calciumionen-Influx aus dem Extrazellulärraum (rezep-

tor- oder potentialgesteuert) und/oder eine Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern zurückzuführen (17). Mit Hilfe des Calciumantagonisten Verapamil, der den transmembranösen Calciumeinstrom hemmt, ließen sich die Kontraktionen weitgehend aufheben.

Die konzentrationsabhängigen Wirksamkeitsverluste bestätigen die von Needleman und Johnson (42, 44) an isolierten Gefäßstreifen der Kaninchenaorta nachgewiesene Toleranzentwicklung gegenüber Glyceryltrinitrat. Die Autoren fanden unter relativ hohen Glyceroltrinitratkonzentrationen (100 - 200 mg/ml $\triangleq$ 4.4 - 8.8 x 10^{-4}mol/l) eine Rechtsverschiebung (maximal um den Faktor 1000) der Konzentrations-Wirkungs-Kurven nach Inkubation (bis 4 Stunden) der Präparate in alkalischer (pH 9.1), nitrathaltiger Badlösung sowie eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkungsschwächung. Die Toleranzentwicklung bei physiologischem pH-Wert (pH 7.4) verursachte nur einen geringen Wirkungsverlust. In früheren Studien an Albinoratten (41, 44) konnte in vivo und in vitro durch hohe GTN-Dosierungen eine Toleranzentwicklung induziert und deren Reversibilität durch Nitratentzug aufgezeigt werden. Die in vivo erzeugte Toleranz erwies sich jedoch bei anschließend isolierten Gefäßstreifen der thorakalen Aorta (in vivo) als irreversibel (41, 44).

Aus diesen Untersuchungen wurde erstmals eine Hypothese für den Mechanismus der Toleranzentstehung gegenüber organischen Nitraten abgeleitet. Danach existiert ein spezifischer "Nitratrezeptor", dessen freie Sulfhydrylgruppen (43, 44) besonders im alkalischen pH-Bereich nach Interaktion mit dem Nitrat unter Bildung von Disulfidbrücken oxidiert werden, wobei es zur Reduktion und Abspaltung der Nitrat-Gruppen kommen soll. Der unter hohen Nitratkonzentratio-

nen und anhaltender Nitratexposition zugunsten dieser Disulfid-Bildung erschöpfte zelluläre Gehalt an SH-Gruppen und die gleichzeitig verminderte Affinität des Rezeptors sollen zu einer geringeren Ansprechbarkeit der glatten Gefäßmuskalatur führen. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtungen unterstützt, daß der Gehalt an SH-Gruppen während der Toleranzentwicklung abnahm und Dithiothreitol (DTT), eine Substanz mit geringem Redoxpotential, die ursprüngliche Wirkung des Glyceroltrinitrat durch Reduktion der Disulfidbrücken wiederherstellen konnte (42, 44). Mit Ethacrynsäure, einem SH-Gruppen-alkylierendem Diuretikum, konnte andererseits der vasodilatatorische Effekt supprimiert werden (43, 44).

Die angesprochenen In-vitro-Untersuchungen (41-44) wurden größtenteils mit relativ hohen Glyceroltrinitrat-Konzentrationen durchgeführt und enthielten zur Bestimmung der einzelnen Konzentrations-Wirkungs-Kurven Intervalle verminderter Gewebe-Nitratkonzentrationen in Form von Auswaschvorgängen, die nach unseren Untersuchungen das Ausmaß der Nitrattoleranz teilweise reduzieren.

Neuere Nachforschungen über den Wirkungsmechanismus zeigten, daß cGMP als intrazellulärer Mediator der Relaxation glatter Muskelzellen durch organische Nitrate und Sydnonimine eine große Rolle spielt (4, 5, 12-14a, 19, 21, 26, 27, 32-35, 46) und daß die cytoplasmatischen cGMP-Spiegel mit dem Ausmaß der Relaxation und der Toleranzentwicklung korrelieren (5, 19, 27). Die Toleranz nach Inkubation von Gefäßstreifen in Lösungen mit hohen Nitratkonzentrationen und die damit verbundene Abnahme der cGMP-Spiegel waren nach Dithiothreitol-Behandlung der Präparate reversibel (5). In den Untersuchungen von Axelsson et al. (5) an Histamin-kontrahierten Rindermesenterialarterien trat nach zweistündiger Inkubation mit 4.4×10^{-4} mol/l

Glyceroltrinitrat bei pH 7.4 keine Toleranz gegenüber der Gefäßdilatation auf, während der intrazelluläre cGMP-Gehalt signifikant reduziert war (5). Im alkalischen Milieu dagegen zeigte sich die Nitrattoleranz auch hinsichtlich der relaxierenden Wirkung. Möglicherweise ist die fehlende Toleranz die Folge von Waschvorgängen zwischen den Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Ferner weisen die Ergebnisse darauf hin, daß sich das cGMP-System in nitratfreier Lösung langsamer erholt als die Relaxation der Gefäße. Die Intrazellulären cAMP-Spiegel, die vor allem bei der Vasodilatation durch Betarezeptorenagonisten erhöht gefunden wurden (58), blieben während der Nitrateinwirkung entweder unverändert (5, 19, 27, 32-35) oder wurden ebenfalls erhöht (4, 46).

Sin-1, der aktive, hepatische Metabolit des Molsidomin beim Menschen, führte in der vorliegenden Untersuchung an Pulmonalvenen des Rindes nicht zur Toleranz. Sin-1 zerfällt unter Ringspaltung pH-abhängig zu Sin-1A, der pharmakologisch wirksamen Form (3, 14a), die in das inaktive Sin-1C (N-Morpholino-iminoacetonitril) übergeht. Bei der Quantifizierung der Toleranzentwicklung mußte daher die Inaktivierung von Sin-1 berücksichtigt werden.

Unsere Untersuchungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Kukovetz et al. (35), die an isolierten Rinderkoronararterien die ausgeprägte Toleranzentwicklung durch organische Nitrate, dagegen nicht durch Sin-1 nachgewiesen haben.

Nach dem derzeitigen Wissensstand geht sowohl der Vasodilatation durch organische Nitratverbindungen als auch durch Sin-1 ein Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels voraus (Abb. 13), der möglicherweise über eine Aktivitätsänderung von Proteinkinasen die Relaxation der glatten Muskulatur herbeiführt. cGMP

könnte, wie man es auch für cAMP vermutet, zu einer Hemmung der Ca^{++}-Kalmodulin-abhängigen Aktivierung des Leichtkettenmyosins führen (12). Verursacht wird der cGMP-Anstieg über eine Stimulation der löslichen Form der Guanylatcyclase. Sin-1A ist, möglicherweise auf Grund einer endständigen, kovalent gebundenen NO-Gruppierung fähig, die Guanylatcyclase direkt und dosisabhängig zu aktivieren, während die wirksame Nitrogruppe der organischen Nitrate zunächst zu Nitrosothiolen (21, 57a, 60a) umgesetzt werden muß (Abb. 13). An dieser Reaktion scheint Glutathion als reduzierender Reaktionspartner beteiligt und für die Toleranzentwicklung mitverantwortlich zu sein. Die Nitrattoleranz ist somit durch eine Erschöpfung des glutathionhaltigen Redoxsystems charakterisiert, das ständig durch das Enzym Glutathionreduktase regeneriert wird (Abb. 13). Sin-1 relaxiert die glatte Muskulatur unabhängig vom zellulären SH-Reservoir und erzeugt keine Toleranz.

Die Toleranzentwicklung, hervorgerufen durch eine übermäßige Beanspruchung dieses Redoxsystems, ist, wie unsere Ergebnisse zeigen, sowohl von der Expositionszeit als auch von der Konzentration abhängig. Wir fanden nach 3.5-stündiger Nitrateinwirkung an den Pulmonalvenen für 10^{-7} mol/l gegenüber 10^{-8} mol/l Glyceroltrinitrat eine um den Faktor 1.53 und für 10^{-4} mol/l gegenüber 10^{-5} mol/l Isosorbid-5-mononitrat eine um den Faktor 1.35 stärker ausgeprägte Toleranzentwicklung. Die rasche Reversibilität (bis zu 81 % nach 55 Minuten) der Nitrattoleranz gegenüber Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat nach nitratfreien Intervallen läßt sich mit einer schnellen Erholung des Redoxsystems erklären.

Neben einer Stimulierung der Guanylatcyclase, die den organischen Nitraten und Sydnoniminen gemeinsam ist, wird auf zellulärer Ebene auch eine Beeinflussung der

transmembranären Chlorid-Ionenfluxe (31) sowie eine Stimulierung der Prostaglandinsynthese (29, 38, 39, 48a, 60) und eine Inhibition der Thromboxanbildung (28, 29, 38, 48a, 60) angenommen, die zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation (28, 29, 38, 46, 54) führen. Für die kausale Abklärung der Nitratwirkung und des Mechanismus der Toleranzentstehung dürfte jedoch dem cGMP-Modell die größte Bedeutung zuzumessen sein, da der Wirkungsverlust sich direkt proportional zur Abnahme der cGMP-Spiegel verhält (5, 6a, 19, 27).

Bei einem Vergleich der Ergebnisse unserer Studie an isolierten Gefäßstreifen des Rindes mit den Ergebnissen neuerer klinischer Langzeituntersuchungen läßt sich eine weitgehende Übereinstimmung der grundsätzlichen Aussagen über die Abhängigkeit der Nitrattoleranz von der Dosis und der Expositionszeit feststellen. Tauchert und Jansen wiesen nach vierwöchiger Monotherapie mit Isosorbid-5-mononitrat (3 x 50 mg/d) Wirkungsverluste hinsichtlich der Arbeitskapazität und des Pulmonalarteriendruckes nach; die Langzeittherapie mit 3 x 20 mg/d über den gleichen Zeitraum ließ eine Toleranzentwicklung vermissen (22, 23, 66, 67). Analoge Ergebnisse wurden auch nach Monotherapie mit Isosorbiddinitrat erzielt (56, 67). So fanden Rudolph et al. bezüglich der antiischämischen Wirkung (ST-Streckensenkung im Belastungs-EKG) von 4 x 40 mg/d nach 14 Tagen bereits deutliche Wirkungsverluste, während mit der Dosierung 2 x 20 mg/d (8.00 und 13.00 Uhr) eine effektive Langzeittherapie durchgeführt werden konnte (56). Silber et al. (63) führten mit einer einmaligen täglichen, peroralen Applikation von 80 mg Isosorbiddinitrat, die von den Patienten über einen Zeitraum von zwei Wochen in 24-stündigen Intervallen eingehalten wurde, eine chronische Therapie ohne Anzeichen einer Toleranzentwicklung durch; Wirkungsverluste stellten sich jedoch

nach der Verkürzung der Einnahmeintervalle auf 12 Stunden ein. Eine Intervalltherapie mit 2 x 20 mg Isosorbiddinitrat (11) ergab keine Hinweise auf eine Toleranzentwicklung und erwies sich für eine dauerhafte antianginöse Therapie als geeignet. Nach einer früheren Untersuchung von Blasini et al. (10) war nach Toleranzinduktion nach Gabe von 4 x 40 mg Isosorbiddinitrat über sieben Tage bereits nach 36-stündigem Nitratentzug die Ansprechbarkeit der hämodynamischen Parameter wieder vollständig gegeben.

Danach liegen sowohl auf Grund der tierexperimentellen Untersuchungen als auch auf Grund klinischer Langzeitstudien Ergebnisse vor, die für eine von der Konzentration und Expositionsdauer der organischen Nitrate abhängige, rasche Toleranzentwicklung sowohl am isolierten Gefäß als auch unter systemischer Applikation sprechen. Die Toleranzentwicklung kann jedoch, wie prinzipiell auch aus unseren Untersuchungen hervorgeht, durch geeignete Therapieschemata unter Berücksichtigung der Dosisabhängigkeit und Zwischenschaltung nitratfreier Intervalle weitgehend vermieden werden, so daß eine chronische Therapie effektiv bleibt. Das in den letzten Jahren wiederholt verfolgte Ziel, hohe und konstante Plasmaspiegel zu erreichen, erscheint somit wenig sinnvoll.

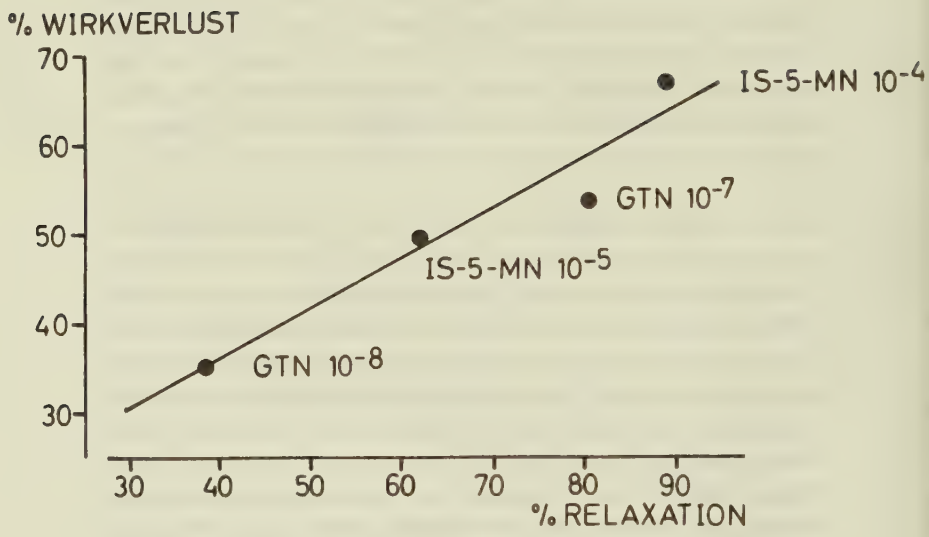

Abb. 12: Korrelation zwischen der vasodilatatorischen Wirkung (in % des Maximaleffektes) der bei den Toleranzuntersuchungen eingesetzten Konzentrationen der organischen Nitrate Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat und dem nach 3.5 Stunden gemessenen Wirkungsverlust (%), ($r = 0.965$). Die Meßwerte für die Relaxation (%) wurden den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der organischen Nitrate (Abb. 4), die Meßwerte für den Wirkungsverlust (%) nach 3.5-stündiger Nitrateinwirkung der Abb. 8 entnommen.

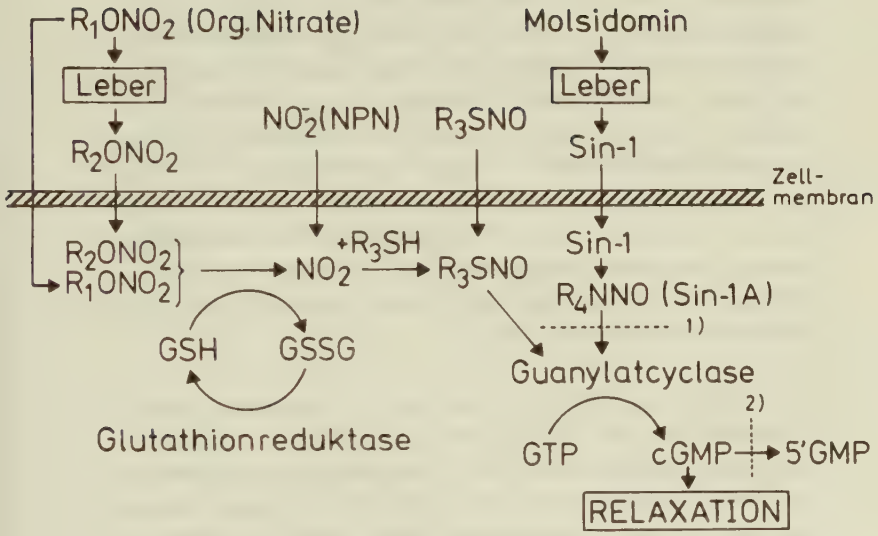

Abb. 13: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von organischen Nitraten bzw. Sin-1A. GSH = Glutathion, R_3-SH = SH-Gruppen-Donatoren, NPN = Nitroprussidnatrium, R_3-SNO = Nitrosothiol.

1) Hemmung durch Methylenblau

2) Hemmung durch cGMP-Phosphodiesteraseinhibitoren (z. B. M & B 22,948).

5. Zusammenfassung

Die Meinungen über eine mögliche Toleranzentwicklung bei der Langzeittherapie kardiovaskulärer Erkrankungen mit organischen Nitraten sind trotz zahlreicher klinischer und tierexperimenteller Studien kontrovers geblieben. Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um eine mögliche Toleranzentwicklung gegenüber Glyceroltrinitrat, Isosorbid-5-mononitrat und Sin-1 an isolierten Gefäßspiralstreifen von Koronararterien, Pulmonalarterien und Pulmonalvenen des Rindes nachzuweisen. Isosorbid-5-mononitrat bzw. Sin-1 sind die wirksamen, hepatischen Metaboliten des Isosorbiddinitrat bzw. Molsidomin. Die verwendeten Gefäße entstammen Regionen, deren Dilatation für die therapeutische Wirkung der organischen Nitrate verantwortlich gemacht wird.

Die Messung der Nitrattoleranz als prozentualer Wirkungsverlust bei kontinuierlicher Nitratexposition bzw. Sin-1-Exposition erfolgte an in regelmäßigen Zeitintervallen kontrahierten Gefäßstreifen. Als Vasokonstriktoren wurden Serotonin, Phenylephrin und Kaliumchlorid verwendet. Es wurden die isometrischen Spannungsänderungen der Gefäßstreifen registriert und zeitlich bedingte Spannungsänderungen durch gleichzeitige Messungen an Kontrollgefäßen bei der Auswertung berücksichtigt. Auswaschexperimente wurden zur Bestimmung der Reversibilität der Toleranz durchgeführt. Geeignete Konzentrationen sowohl der Vasokonstriktionen als auch der Vasodilatatoren zur Messung der Toleranzentwicklung ergaben sich aus kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven.

Die Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

1) Die organischen Nitrate Glyceroltrinitrat (10^{-7}, 10^{-8} mol/l) und Isosorbid-5-mononitrat 10^{-4} mol/l) induzieren an Koronararterien und Pulmonalarterien des Rindes signifikante Wirkungsverluste als Ausdruck einer Toleranzentwicklung, die nach 3.0 bzw. 3.5 Stunden zwischen 35 und 65 % der Initialwirkung liegen. Isosorbid-5-mononitrat weist nach 15.5 Stunden keinen vasodilatatorischen Effekt mehr auf. Die Wirkungsabschwächung ist abhändig von der Expositionsdauer, jedoch weitgehend unabhängig vom verwendeten vasokonstriktorischen Stimulus (Serotonin, Phenylephrin, Kaliumchlorid).

2) Bei kontinuierlicher Exposition gegenüber Glyceroltrinitrat (10^{-7}, 10^{-8} mol/l) und Isosorbid-5-mononitrat (10^{-4}, 10^{-5} mol/l) sind an Pulmonalvenen des Rindes nach 3.5 Stunden Wirkungsverluste zwischen 35 und 70 % der Initialwirkung nachweisbar. Nach 15.5 Stunden ist die Toleranz jeweils nahezu vollständig. Die Wirkungsabschwächung ist sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Nach 3.5-stündiger Nitrateinwirkung weisen 10^{-7} gegenüber 10^{-8} mol/l Glyceroltrinitrat eine um den Faktor 1.53 und 10^{-4} gegenüber 10^{-5} mol/l Isosorbid-5-mononitrat eine um den Faktor 1.35 stärker ausgeprägte Toleranzentwicklung auf.

3) Das Ausmaß des während 3.5-stündiger Nitratexposition gemessenen Wirkungsverlustes an der Pulmonalvene korreliert zu der vasodilatatorischen Wirkung der Nitratkonzentrationen und ist folgendermaßen abgestuft:
IS-5-MN 10^{-4} mol/l > GTN 10^{-7} mol/l > IS-5-MN 10^{-5} mol/l > GTN 10^{-8} mol/l.

4) Die Toleranzentwicklung gegenüber Glyceroltrinitrat (10^{-7} mol/l) und Isosorbid-5-mononitrat (10^{-4} mol/l) an der Pulmonalvene ist durch Zwischenschaltung nitratfreier Intervalle von 70- bis 140-minütiger Dauer bis zu ca. 80 % reversibel.

5) Sin-1 induziert unter Berücksichtigung des Substanzzerfalls in der Badlösung auch nach 4.7 Stunden keine signifikante Wirkungsabschwächung und zeigt somit bei Pulmonalvenen keine Toleranzentwicklung.

Die Ergebnisse zeigen eine Toleranzentwicklung gegenüber organischen Nitraten, die nicht nur, wie bereits bekannt, an isolierten Arterien sondern auch an Venen auftritt. Die Toleranz läßt sich durch Einschaltung nitratfreier Intervalle in kurzer Zeit aufheben. Unter Berücksichtigung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Toleranzinduktion ist es daher wenig sinnvoll, während einer antianginösen Therapie hohe und konstante Plasmaspiegel aufrechtzuerhalten. Dies konnte inzwischen auch in klinischen Studien nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abrams, J.: Nitrate tolerance and dependence. Am. Heart J. 99, No. 1, 113 - 123 (1980)

2. Abrams, J.: Toleranzentstehung nach Langzeitnitraten? Herz/Kreislauf 11, 590 - 597 (1982)

3. Asahi, Y., Shinozaki, K., Nagaoka, M.: Chemical and Kinetic Study on Stabilities of 3-Morpholinosydnonimine and Its n-Ethoxycarbonyl Derivative. Chem. Pharm. Bull. 19, No. 6, 1079 - 1088 (1971)

4. Axelsson, K.L., Andersson, R.G.G., Wikberg, J.E.S.: Correlation between Vascular Smooth Muscle Relaxation and Increase in Cyclic GMP Induced by some Organic Nitro Esters. Acta Pharmacol. Toxicol. 49, 270 - 276 (1981)

5. Axelsson, K.L., Andersson, R.G.G., Wikberg, J.E.S.: Vascular Smooth Muscle Relaxation by Nitro Compounds: Reduced Relaxation and cGMP Elevation in Tolerant Vessels and Reversal of Tolerance by Dithiothreitol. Acta Pharmacol. Toxicol. 50, 350 - 357, (1982)

6. Bacher, S., Kraupp, O., Stanek, B., Raberger, G.: The effect of repeated intravenous and oral doses of molsidomine (N-carboxy-3-morpholino-sydnonimine-ethylester) on plasma renin activity and plasma catecholamine levels in conscious dogs. Basic Res. Cardiol. 78, 193 - 202 (1983)

6a Bartsch, W., Sponer, G., Strein, K., Müller-Beckmann, B.: Lack of evidence for the Role of Prostaglandins in the vasodilating effect of organic nitrates. ICRS Medical Science: Pharmacology 11, 67 - 68 (1983)

7. Becker, H.-J., Walden, G., Kaltenbach, M.: Gibt es eine "Tachyphylaxie" beziehungsweise Gewöhnung bei der Behandlung der Angina pectoris mit Nitrokörpern? Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 82, 1208 - 1210, J. F. Bergmann, München (1976)

8. Blasini, R., Brügmann, U., Mannes, A., Froer, K.-L.: Wirksamkeit von Isosorbiddinitrat in retardierter Form bei Langzeitbehandlung. Herz 5, 298 - 305 (1980)

9. Blasini, R., Mannes, A., Brügmann, U., Rudolph, W.: Molsidomin zur Langzeitbehandlung der Angina pectoris. Z. Kardiol. 70, 269 (1981)

10. Blasini, R., Froer, K.-L., Blümel, G., Rudolph, W.: Wirkungsverlust von Isosorbiddinitrat bei Langzeitbehandlung der chronischen Herzinsuffizienz. Herz 7, 250 - 258 (1982)

11. Blasini, R., Reiniger, G., Brügmann, U., Rudolph, W.: Vermeidung einer Toleranzentwicklung unter Isosorbiddinitrat durch Intervalltherapie. Herz 9, 166 - 170 (1984)

12. Böhme, E., Grossmann, G., Spies, C.: Effects of molsidomine and other NO-containing vasodilators on cyclic GMP formation. Eur. Heart J. 4, Suppl. C, 19 - 24 (1983)

13. Böhme, E., Grossmann, G., Herz, J., Mülsch, A.: Regulation of Cyclic GMP Formation by Soluble Guanylate Cyclase: Stimulation by NO-Containing Compounds. Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphoryl. Res. 17, 259 - 266 (1984)

14. Böhme, E., Grossmann, G., Spies, C.: Stimulierung der cGMP-Bildung durch Molsidomin und organische Nitrate. Med. Prax., Sondernr. 1, 18 - 23 (1984)

14a Böhme, E., Grossmann, G., Spies, C., Mülsch, A.: Biochemischer Wirkungsmechanismus von Molsidomin. Med. Klin. Sondernr. 1, 12 - 16 (1985)

15. Chasseaud, L.F., Down, W.H., Sacharin, R.M.: Effect of repeated oral administration of isosorbide dinitrate on hepatic glutathione S-transferase activity in the rat. Biochem. Pharmacol. 27, 1695 - 1697 (1978)

16. Chasseaud, L.F.: Newer Aspects of the Pharmacokinetics of Organic Nitrates. Z. Kardiol. 72, Suppl. 3, 20 - 23 (1983)

17. Fleckenstein-Grün, G., Fleckenstein, A.: Calcium antagonism, a basic principle in vasodilation. In: Calcium Antagonism in Cardiovascular Therapy - Experience with Verapamil, ed. by Zanchetti, A., Krikler, D.M.. Exerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 30 - 48 (1981)

18. Franciosa, J.A., Cohn, J.N.: Sustained Hemodynamic Effects Without Tolerance During Long-Term Isosorbid Dinitrate Treatment of Chronic Left Ventricular Failure. Am. J. Cardiol. 45, 648 - 654 (1980)

19. Galvas, P.E., DiSalvo, J.: Concentration and Time-Dependent Relationships between Isosorbide Dinitrate - Induced Relaxation and Formation of Cyclic GMP in Coronary Arterial Smooth Muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 224, No. 2, 373 - 378 (1983)

20. Girre, C., Crouzette, J., Fournier, P.E.: Taux plasmatiques de nitroglycérine après administration orale et percutanée. Nouv. Presse Med. 9, 2433 - 2436 (1980)

21. Ignarro, L.J. Edwards, J.C., Gruetter, D.Y., Barry, B.K.: Possible involvement of S-nitrosothiols in the activation of guanylate cyclase by nitroso compunds. FEBS Lett. 110, 275 - 278 (1980)

21a Ignarro, L.J., Gruetter, C.A.: Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by Glyceryl Trinitrate and sodium nitrite. Possible Involvement of S-nitrosothiols. Biochim. Biophys. Acta 631, 221 - 231 (1980)

22. Jansen, W., Osterspey, A., Tauchert, M., Schmid, G.: 5-Isosorbidmononitrat unter Ruhe- und Belastungsbedingungen bei koronarer Herzkrankheit. Dtsch. Med. Wochenschr. 107, 1499 - 1506 (1982)

23. Jansen, W., Osterspey, A., Fuchs, M., Tauchert, M.: Hämodynamische Wirkung von 20 mg und 50 mg 5-Isosorbidmononitrat unter akuter und chronischer Therapie. Med. Welt 33/48, 1756 - 1762 (1982)

24. Jansen, W., Osterspey, A., Metternich, M., Weste, S.: Fehlende Toleranzentwicklung unter chronischer Behandlung mit täglich 60 mg Isosorbiddinitrat oder 60 mg 5-Isosorbidmononitrat. Herz/Kreislauf 7, 338 - 353 (1983)

25. Jansen, W., Osterspey, A., Schell, U., Tauchert, M.: Zur Frage der Kreuztoleranz zwischen Nitraten und Molsidomin. Med. Prax. Sondernr. 1, 39 - 46 (1984)

26. Katsuki, S., Arnold, W.P., Murad, F.: Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 239 - 247 (1977)

27. Keith, A., Burkman, A.M., Sokoloski, T.D., Fertel, R.H.: Vascular Tolerance to Nitroglycerin and Cyclic GMP Generation in Rat Aortic Smooth Muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 221, 525 - 531 (1982)

28. Klaus, W., Darius, H., Ahland, B., Bussmann, K.: Experimentelle Befunde zur Hemmung der Thrombozytenaggregation unter Molsidomin. In: Molsidomin - Neue Aspekte zur Therapie der ischämischen Herzerkrankung, 3. Internationales Symposium, Rottach-Egern, 1982. Bassenge, E., Schmutzler, H. (Herausg.), Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 73 - 77 (1982)

29. Klaus, W.: Zur Wirkungsweise Preload-senkender Pharmaka: Vergleich von Molsidomin und Nitraten. Med. Prax. Sondernr. 1, 7 - 11 (1984)

30. Kober, G., Grossmann, R., Schulz, W., Kaltenbach, M.: Wirkung von Nitroglycerin auf den Durchmesser peripherer, arterieller und venöser Lungengefäße. In Nitrate III - Kardiovaskuläre Wirkungen. Engel, H.J., Schrey, A., Lichtlen, P.R. (Herausg.), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 304 - 309 (1982)

31. Kreye, V.A.W., Kern, R., Ziegler, F.: Zum vaskulären Wirkungsmechanismus anorganischer und organischer Nitratverbindungen: Einfluß auf monovalente Ionenfluxe der Gefäßmuskulatur. In: Nitrate II - Wirkung auf Herz und Kreislauf. Rudolph, W., Schrey, A. (Herausg.), Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 2 - 7 (1980)

32. Kukovetz, W.R., Holzmann, S., Wurm, A., Pöch, G.: Evidence for Cyclic GMP-Mediated Relaxant Effects of Nitro-Compounds in Coronary Smooth Muscle. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 310, 129 - 138 (1979)

33. Kukovetz, W.R., Holzmann, S.: Mechanism of Nitrate-Induced Vasodilation and Tolerance. Z. Kardiol. 72, Suppl. 3, 14 - 19 (1983)

34. Kukovetz, W.R., Holzmann, S., Straka, M., Pöch, G.: On the Molekular Mode of Action of Nitroglycerin. Vascular Neuroeffector Mechanisms - 4th International Symposium, ed. by Bevan, J.A. et al., Raven Press New York, 145 - 150 (1983)

35. Kukovetz, W.R., Holzmann, S.: Der Wirkungsmechanismus von Molsidomin und Nitraten. Med. Prax. Sondernr. 1, 12 - 17 (1984)

36. Lee, G., Mason, D.T., DeMaria, A.N.: Effects of Long-Term Oral Administration of Isosorbide Dinitrate On the Antianginal Response to Nitroglycerin. Am. J. Cardiol. 41, 82 - 87 (1978)

37. Leier, C.V., Huss, P., Magorien, R.D.: Improved Exercise Capacity and Differing Arterial and Venous Tolerance During Chronic Isosorbide Dinitrate Therapy for Congestive Heart Failure. Circulation 67, 817 - 822 (1983)

38. Levin, R.I., Jaffe, E.A., Weksler, B.B., Tack-Goldman, K.: Nitroglycerin Stimulates Synthesis of Prostacyclin by Cultured Human Endothelial Cells. J. Clin. Invest. 67, 762 - 769 (1981)

39. Mehta, J., Mehta, P., Ostrowski, N.: Effects of nitroglycerin on human vascular prostacyclin and thromboxane A_2 generation. J. Lab. Clin. Med. 102, 116 - 125 (1983)

39a Mucharlsjamov, N.M., Grigor'janz, R.A., Lobova, N.M., Mareev, V. Ju.: Akut- und Langzeitbehandlung der chronischen Herzinsuffizienz mit Molsidomin. Med. Klin. Sondernr. 1, 86-89 (1985)

40. Needleman, P., Blehm, D.J., Rotskoff, K.S.: Relationship between glutathione-dependent denitration and the vasodilator effectiveness of organic nitrates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 165, 286 - 288 (1968)

41. Needleman, P.: Tolerance to the vascular effects of Glyceryl Trinitrate. J. Pharmacol. Exp. Ther. 171, 98 - 102 (1969)

42. Needleman, P., Johnson, E.M.: Mechanism of tolerance development to organic nitrates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 184, 709 - 715 (1972)

43. Needleman, P., Jakschik, B., Johnson, E.M.: Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 324 - 331 (1973)

44. Needleman, P., Johnson, E.M.: Sulfhydryl Reactivity of Organic Nitrates: Tolerance and Vasodilation. Vascular Neuroeffector Mechanisms, 2nd International Symposium 1975, 208 - 215 (Karger, Basel 1976)

45. Niederer, W., Bethge, H.D., Bachmann, K.: Hämodynamische und ventrikeldynamische Untersuchungen zur Frage der Nitrattoleranz. In: Nitrate und Nitrattoleranz in der Behandlung der koronaren Herzerkrankung. Kober, G., Kaltenbach, M. (Herausg.), Steinkopff Verlag Darmstadt, 65 - 75 (1983)

46. Nishikawa, M., Kanamori, M., Hidaka, H.: Inhibition of Platelet Aggregation and Stimulation of Guanylate Cyclase by an Antianginal Agent Molsidomine and Its Metabolites. J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 183 - 190 (1981)

47. Noak, E.: Comparison of the vasodilator effectiveness and tolerance inducing potency of various organic nitrates in the perfused guinea pig heart preparation. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, Suppl. 1, 65 (1981)

48. Noak, E.: Pharmakologische Basis für die Therapie mit organischen Nitraten. Herz 7, 275 - 285 (1982)

48a Oetliker, O., Perisic, M.: Der Einfluß von SIN-1 auf den Prostaglandinstoffwechsel menschlicher Fibroblasten. Med. Klin. Sondernr. 1, 24 - 26 (1985)

49. Oltmanns, D. Friedmann, W., Ostrowski, J.: Zur Pharmakokinetik von Molsidomin bei hochdosierter Langzeitbehandlung des frischen Herzinfarktes. Herzmedizin 5, 141 - 146 (1982)

50. Osterspey, A., Jansen, W., Tauchert, M.: Hämodynamik und Belastbarkeit bei akuter und chronischer Gabe von Molsidomin. Med. Prax. Sondernr. 1, 47 - 53 (1984)

51. Ostrowski, J.: Zur Pharmakokinetik von Corvaton beim Menschen. In: Molsidomin - Neue Aspekte in der Therapie der ischämischen Herzerkrankung, 1. Molsidomin Symposium, München 1978, Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 69 - 73 (1979)

52. Parker, J.O.: Nitrate tolerance. Herz 9, 137 - 145 (1984)

53. Reiniger, G., Basini, R., Brügmann, U., Rudolph, W.: Toleranzentwicklung hinsichtlich der antiischämischen Wirkung von Isosorbiddinitrat bei regelmäßiger, mehrfach täglicher Verabreichung. Herz 9, 146 - 152 (1984)

54. Rettkowski, W. Pönicke, K., Block, H.U., Gießler, Ch.: Studies on the Influence of Nitroglycerin on the Synthesis of Prostaglandins and Thromboxane A_2 and on Platelet Aggregation. Arzneim. Forsch. 32 (1), 194 - 200 (1982)

55. Rietbock, N., Lassmann, A., Woodcock, B.G.: Toleranz - Pharmakokinetische und pharmakodynamische Aspekte. In: Nitrate und Nitrattoleranz in der Behandlung der koronaren Herzerkrankung. Kober, G., Kaltenbach, M. (Herausg.), Steinkopff Verlag Darmstadt, 3 - 11 (1983)

56. Rudolph, W., Blasini, R., Reiniger, G., Brügmann, U.: Tolerance Development During Isosorbide Dinitrate Treatment: Can it be Circumvented? Z. Cardiol. 72, Suppl. 3, 195 - 198 (1983)

57. Rudolph, W., Blasini, R.: Nitrattoleranz: ein klinisch bedeutsames Problem? Herz 9, 115 - 122 (1984)

57a Saville, B.: A Scheme for the Colorimetric Determination of Microgram Amounts of Thiols. Analyst 83, 670 - 672 (1958)

58. Scheid, C.R., Honeyman, T.W., Fay, F.S.: Mechanism of ß-adrenergic relaxation of smooth muscle. Nature 277, 32 - 36 (1979)

59. Schraven, E.: Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung von Molsidomin beim Tier. In: Molsidomin - Neue Aspekte in ter Therapie der ischämischen Herzerkrankung, 1. Molsidomin Symposium, München 1978, Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 24 - 27 (1979)

60. Schrör, K., Grodzinska, L., Darius, H.: Stimulation of Coronary Vascular Prostaglandin and Inhibition of Human Platelet Thromboxane A_2 after Low-Dose Nitroglycerin. Thromb. Res. 23, 59 - 67 (1981)

60a Schulz, U., McCalla, D.R.: Reactions of cysteine with N-methyl-N-nitroso-p-toluenesufonamide and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Can. J. Chem. 47, 2021 - 2027 (1969)

61. Schuster, P., Trieb, G., Wiechmann, H.W.: Hemodynamic Effects of Isosorbide-5-Mononitrate in Acute and Chronic Treatment of Coronary Heart Disease. Z. Kardiol. 72, Suppl. 3, 251 - 254 (1983)

62. Schwarzer, Ch., Mlczoch, J.: Zur Frage der Toleranzentwicklung von Isosorbid-5-mononitrat. Herz/Kreislauf 11, 585 - 589 (1982)

63. Silber, S., Krause K.H., Garner, C., Theisen, K.: Anti-Ischemic Effects of an 80-mg Tablet of Isosorbide Dinitrate in Sustained-Release Form Before and After 2 Weeks Treatment with 80 mg Once Daily or Twice Daily. Z. Kardiol. 72, 211 - 217 (1983)

64. Steudel, H., Steudel, A., Bonn, R.: Pharmakokinetik von Isosorbid-5-mononitrat nach wiederholter Gabe von 5 mg oral. In: Mononitrat - 2. Workshop Kronberg, Februar 83. Köhler, E., Noak, E., Schrey, A., Weiß, M. (Herausg.), Universitätsdruckerei und Verlag Dr. C. Wolf und Sohn, München, 38 - 45 (1983)

65. Tauchert, M., Jansen, W., Osterspey, A.: Zur Frage der Toleranzentwicklung unter antianginöser Therapie. In: Molsidomin - Neue Aspekte zur Therapie der ischämischen Herzerkrankung, 3. Internationales Symposium, Rottach-Egern 1982, Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 201 - 210 (1982)

66. Tauchert, M., Jansen, W., Osterspey, A., Fuchs, M.: Dose Dependence of Tolerance During Treatment with Mononitrates. Z. Kardiol. 72, Suppl. 3, 218 - 228 (1983)

67. Tauchert, M. Jansen, W., Metternich, M. Osterspey, A.: Langzeittherapie mit Nitraten, Herz 9, 153 - 165 (1984)

67a Tauchert, M., Ostespey, A., Jansen, W.: Langzeitwirkung von Molsidomin bei koronarer Herzkrankheit. Med. Klin. Sondernr. 1, 58 - 61 (1985)

68. Thadani, U., Manyari, D., Parker, J.O.: Tolerance to the Circulatory Effects of Oral Isosorbide Dinitrate - Rate of Development and Cross-tolerance to Glyceryl Trinitrate. Circulation 61, 526 - 535 (1980)

69. Thadani, U., Fung, H., Darke, C., Parker, J.O.: Oral Isosorbide Dinitrate in Angina Pectoris: Comparison of Duration of Action and Dose-Response Relation During Acute and Sustained Therapy. Am. J. Cardiol. 49, 411 - 419 (1982)

70. Winbury, M.M., Howe, B.B., Hefner, M.A.: Effect of nitrates and other coronary dilators on large and small coronary vessels: An hypothesis for the mechanism of action of nitrates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 168, 70 - 95 (1969)

Lebenslauf

Am 7. Mai 1960 wurde ich, Martin, Konrad, Walter HEIDRICH, wohnhaft in Düsseldorf, als ältester Sohn des städtischen Veterinärdirektors Dr. med. vet. Konrad-Maximilian HEIDRICH und seiner Ehefrau Ingeborg, geborene Wagner, in Düsseldorf geboren.

Vom 05.07.1966 bis zum Sommer 1970 besuchte ich die Grundschule in Düsseldorf und wechselte anschließend auf das Rethel-Gymnasium (Düsseldorf), wo ich im Juni 1979 das Abitur mit den Leistungsfächern Mathematik und Chemie ablegte. Anschließend hatte ich die Gelegenheit, für zwei Monate in der toxikologischen Abteilung der Firma Henkel zu arbeiten.

Zum Wintersemester 1979/80 immatrikulierte ich mich für einen Studienplatz der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. Ärztliche Vorprüfung am 25.08.1981, erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 26.08.1982, zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 24.08.1984, Praktisches Jahr im evangelischen Lehrkrankenhaus Bethesda in Duisburg (Wahlfach Nuklearmedizin), dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 05.11.1985 nach 12 Semestern.

Während des Studiums war ich ca. 14 Monate im Institut für Pharmakologie (Dir. Prof. Dr. Greeff) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. U. Borchard als Doktorand tätig.

Düsseldorf, November 1985

Kurzfassung

Die vorliegende Untersuchung wurde zum Thema der Toleranzentwicklung gegenüber organischen Nitraten und Sin-1, dem hepatischen Metaboliten des Molsidomin, durchgeführt. Bei Dauerexposition isolierter arterieller und venöser Gefäßstreifen des Rindes gegenüber Glyceroltrinitrat und Isosorbid-5-mononitrat zeigte sich ein Wirkungsverlust als Ausdruck einer rasch einsetzenden Nitrattoleranz von 35 bis 70 % des Initialeffektes bereits nach 3.5 Stunden. Nach einer Inkubationszeit von 15.5 Stunden ließ sich kein vasorelaxierender Effekt mehr nachweisen. Das Ausmaß der Wirkungsabschwächung erwies sich als sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig, d.h. höhere Konzentrationen induzierten ein schnelleres und ausgeprägteres Wirkungsdefizit. Die Toleranzentwicklung beider organischen Nitrate war nach nitratfreien Intervallen von 70- bis 140-minütiger Dauer bis zu ca. 80 % reversibel.
Sin-1, ein Derivat der Sydnonimine, induzierte unter identischen Bedingungen keine signifikante Toleranzentwicklung. Grund dafür ist vermutlich ein von den organischen Nitraten abweichender intrazellulärer Wirkungsmechanismus.